

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par le
**Centre international d'études supérieures en sciences
agronomiques
Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale **GAIA**
Et de l'unité de recherche **UMR BGPI**

Spécialité : **Biologie des Interactions**

Présentée par **Déborah CONFLON**

**Evaluation de la capacité du Tomato yellow
leaf curl virus à maintenir des ADN
satellites**

Soutenue le 16 Décembre 2015 devant le jury composé de

Mme Cécile Desbiez, Chercheur, INRA, Avignon

Rapporteur

M. Bruno Gronenborn, Directeur de Recherche, CNRS, Paris

Rapporteur

Mme Claire Neema, Professeur, SupAgro Montpellier

Examinatrice

M. Michel Peterschmitt, Chercheur, CIRAD, Montpellier

Dir. de thèse

Invité

Pascal Gentit, Chercheur, ANSES, Angers

Co-dir. de thèse

Cica Urbino, Chercheur, CIRAD, Montpellier

Co-dir. de thèse

RESUME

Les virus du genre Begomovirus (famille Geminiviridae) sont fréquemment détectés en association avec des ADN satellites appelées alphasatellite et betasatellite qui font la moitié de la taille du génome viral. L'alphasatellite est autonome pour sa réplication et dépend du virus pour son mouvement et son encapsidation tandis que le betasatellite est dépendant de ces fonctions virales. L'alphasatellite a rarement été montré comme ayant un impact sur le virus assistant, contrairement au betasatellite qui augmente la virulence de son virus assistant. En dehors des bégomovirus tels que le Cotton leaf curl virus (CLCuV) qui ont besoin d'un betasatellite pour initier une infection symptomatique dans leur hôte naturel, la plupart des bégomovirus peuvent causer des symptômes, même sans les satellites avec lesquels ils sont parfois détectés. Le Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), un des virus les plus dommageables dans le monde a rarement été détecté associé à des ADN satellites. Les souches méditerranéennes qui sont aussi les plus invasives, n'ont jamais été détectées avec des ADN satellites, bien qu'elles soient capables en conditions artificielles de les assister avec pour conséquence une considérable augmentation de la virulence en cas de co-inoculation avec un betasatellite. Le risque potentiel d'association de satellites avec le TYLCV-Mld a été évalué en testant divers facteurs potentiellement impliqués dans le maintien de l'association TYLCV-satellite: (i) l'accumulation relative intra-plante du TYLCV et des satellites, (ii) la fréquence de co-infection au niveau cellulaire du TYLCV et des satellites, et (iii) l'efficacité de transmission des satellites par le vecteur Bemisia tabaci. Trois satellites précédemment isolés sur coton au Burkina Faso ont été montrés comme pouvant être assistés par le TYLCV dans des plantes de tomate: Cotton leaf curl Gezira betasatellite (CLCuGB), Cotton leaf curl Gezira alphasatellite (CLCuGA) et Okra leaf curl Burkina Faso alphasatellite (OLCBFA). La quantification par PCR quantitative des ADN du TYLCV et des trois satellites entre 11 et 150 jours après inoculation (dpi) révèle qu'en général, les satellites ont une accumulation supérieure à celle du virus, et que, contrairement aux alphasatellites qui n'ont aucun impact, le betasatellite affecte l'accumulation du TYLCV-Mld. Bien que le rapport des quantités de virus/satellites varie au cours du temps, les satellites sont maintenus avec le TYLCV-Mld au temps tardif de 150 dpi et sont transmis par B. tabaci à 32 et 150 dpi. Le TYLCV-IL interagit différemment avec le CLCuGB car son accumulation n'est pas affectée dans les plantes coinfectées. L'estimation par la technique FISH à 18 et 32 dpi de la fréquence d'association des molécules au niveau cellulaire montre que plus de la moitié des cellules infectées sont coinfectées par le TYLCV et un satellite. Ce résultat est cohérent avec la fréquence observée d'ADN satellite dans les plantes. Cependant, on observe de manière inattendue un nombre important de cellules ne semblant contenir que le betasatellite, ce qui pose des questions sur le fonctionnement des associations virus/satellites. Comme la multiplicité d'infection (MOI) des bégomovirus et des satellites est attendue pour être un facteur déterminant de l'efficacité de la co-infection cellulaire, deux variants équicompetitifs de TYLCV ont été préparés afin de déterminer ce paramètre. Enfin, des amorces PCR permettant la détection générique de betasatellites ont été dessinées pour être utilisées dans le diagnostic par l'Agence française pour l'alimentation, l'environnement et la santé et sécurité au travail (ANSES). Outre les conséquences agronomiques d'un maintien possible des satellites avec le TYLCV, les résultats de cette étude donnent un aperçu novateur sur les interactions entre les bégomovirus et les satellites, au niveau de la plante, au niveau cellulaire et moléculaire.

ABSTRACT

Begomoviruses (family Geminiviridae) are frequently detected with half genome sized defective virus DNAs, and for some of them with satellite DNAs of similar size, i.e. alphasatellite and betasatellite. Both molecules rely on the virus for maintenance in plant. The alphasatellite was rarely proved to have an impact on the helper virus but the betasatellite was often shown to increase its virulence. Except some begomoviruses, like Cotton leaf curl virus (CLCuV) which rely on a betasatellite for a full symptomatic infection in its natural host plant, most of the begomoviruses which were frequently detected with satellites do not rely on them for infectivity. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) is one of the most damaging begomovirus worldwide. The Mediterranean IL and Mld strains, the most invasive ones, were never detected in association with satellites, although they were experimentally proved to readily assist them for replication and movement in plant. This was particularly true for betasatellites and resulted in a dramatic increase in the virulence of TYLCV. The potential of a TYLCV-satellite association was assessed by testing various factors involved in the maintenance of both molecules in tomato plants: (i) the relative intra-plant accumulation of TYLCV and satellites, (ii) the frequency of host cells co-infected with TYLCV and satellites, and (iii) the transmission efficiency of satellites by the natural whitefly vector of TYLCV, *Bemisia tabaci*. Three satellites previously isolated from okra in Burkina Faso, were shown here to be assisted by TYLCV in tomato plants: Cotton leaf curl Gezira betasatellite (CLCuGB), Cotton leaf curl Gezira alphasatellite (CLCuGA) and Okra leaf curl Burkina Faso alphasatellite (OLCBFA). The dynamic of TYLCV and satellite DNAs monitored between 11 and 150 days post-inoculation (dpi) by quantitative PCR revealed that satellites accumulated at a higher level than the virus, and that, in contrast with alphasatellites which have no impact, betasatellites affected TYLCV-Mld accumulation. Although the ratio of virus/satellite amounts varies over time, satellites were maintained in all test plants up to 150 dpi and were readily transmitted at 32 and 150 dpi. TYLCV-IL interacts differentially with CLCuGB as its accumulation was not affected in the coinfecting plants. At 32 dpi, the TYLCV/satellite infection status of plant cells was determined by FISH and more than 50% of the monitored infected cells were co-infected with TYLCV and a satellite. The infection status was consistent with the frequency of satellite DNA in plants. Unexpectedly a substantial number of cells were positive only for betasatellite, suggesting that the coinfection with the virus could be dispensable for replication. This observation raises question on the functioning of virus/satellite association or multipartite viruses. As the multiplicity of infection (MOI) of begomoviruses and satellites is expected to be a determinant of the efficiency of virus/satellite cell coinfection, two equi-competitive TYLCV variants were prepared to determine this parameter for TYLCV. Finally, PCR primers designed for the generic detection of betasatellites were designed to be used as a diagnostic tool by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES). Besides the agronomic concern of the possible maintenance of DNA satellites with TYLCV, the results of our study are expected to provide a new insight on the interactions between begomovirus and satellites, at the plant, cellular and molecular levels.

Laboratoire d'accueil



UMR - BGPI
Biologie et Génétique
des Interactions Plante-Parasite

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe :

Interactions Virus Insecte Plante (VIP)

Sous la Direction de :

Dr Michel Peterschmitt, Directeur de Recherche CIRAD, Montpellier - Directeur de thèse

Dr Pascal Gentit, Chercheur, ANSES, Angers – Co-Directeur de thèse

Dr Cica Urbino, Chercheur, CIRAD, Montpellier – Co-Directeur de thèse

UMR Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite (BGPI)

INRA-CIRAD-SupAgro

Campus International de Baillarguet

34398 Montpellier cedex 5

France



REMERCIEMENTS

Je remercie, tout d'abord, les membres de mon jury pour le temps consacré à l'évaluation de mon travail : Mme Claire Neema, Mme Cécile Desbiez et M. Bruno Gronenborn.

Je souhaite également remercier les membres de mon comité de thèse pour leurs conseils : Mme Eugénie Hebrard, Mme Véronique Ziegler-Graff, M. Sérafin Gutierrez, M. Stéphane Blanc et M. Pascal Gentit.

Je remercie également Philippe Rott puis Claire Neema pour leur accueil au sein de l'UMR BGPI.

Merci au CIRAD et à l'ANSES d'avoir accepté de financer ce projet.

Merci à Stéphane Blanc de m'avoir accueillie au sein de l'équipe VIP, et de faire que cette équipe soit un super environnement de travail, que ce soit au niveau de la qualité de l'enseignement scientifique ou de l'ambiance de travail.

Je tiens tout particulièrement à remercier mes encadrants, Michel Petershmitt et Cica Urbino, sans qui ce travail n'aurait pas été possible. C'est vrai que ça n'a pas toujours été facile, merci de m'avoir remotivée dans mes moments de doute et de m'avoir soutenue jusqu'à la fin. Tout au long de ces 3 années passées ensemble j'ai appris beaucoup de choses, tant au niveau professionnel que sur moi-même.

Merci à Michel pour son enthousiasme à toutes épreuves, ses conseils et le partage de sa passion pour la recherche.

Une grand merci à Cica pour son accompagnement, ses conseils et sa franchise. Merci aussi pour avoir su me remonter le moral mais aussi les bretelles quand c'était nécessaire.

Un grand merci à ma maman du labo, Martine. Je retiens ton dévouement ta douceur et ta gentillesse. Tu resteras une de mes plus belles rencontres dans cette aventure.

Merci à mes encadrants/collaborateurs de l'ANSES, Pascal Gentit et Anne Saison pour m'avoir accueillie dans leurs locaux. Merci à Pascal pour son encadrement et pour nos échanges toujours très constructifs.

Merci à tous les membres de l'UMR qui m'ont aidée dans mes travaux. Merci à Jean Luc et Sophie pour avoir su gérer toutes les manips du S3, même quand elles étaient ENORMES. Merci à François, Gael et Juliette pour leurs conseils et leur aide en stat. Merci à Sérafin pour toute son aide et ses conseils. Merci à Nathalie et Isa. P. pour toute l'aide qu'elles m'ont apportée en radioc. Merci à Martin, Daniel et Marie-Steph pour les conseils qu'ils m'ont donnés en microscopie. Merci à Denis qui m'a bien aiguillée dans mes travaux de bioinfo. Merci à Marie-Carmen qui m'a bien simplifiée la vie dans tous les aspects administratifs et merci à Domi pour le sauvetage *in extremis* de la mise en page.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe VIP pour leur bonne humeur et tous les bons moments passés. En particulier Sophie, Aurélie, Marie Steph, Elodie, Anne, et Mich-Mich pour m'avoir aidée à m'intégrer à mon arrivée, et Jean louis, Manuella, Craig, Maryline, Nane, Daniel pour toutes les discussions scientifiques, ou pas, que nous avons partagées.

Toutes les personnes avec qui j'ai papoté dans les couloirs (quasiment tout le monde) en particulier les « sportifs » : Isa, Sonia, Agnès, Aurélie, Coco, les Véro, Joëlle, Emmanuel et Michel, et tous les autres : Charlotte, Manu, les Romains, Christoph, Jean François, Marie-Jo, Katia, Les Remi, Gene, Marlène, Henri et tous les autres. Sans oublier les membres de l'apéro du vendredi, ils se reconnaîtront...

Mes collègues thésard de BGPI : Anne, Zineb, Emilie, Loup, Aurélie, Souhir, Diana, Pauline, Maelle, Marie (c'est comme si tu en faisais partie), et celles d'ailleurs : Dora, Mag, Clara et Patricia.

Mes compagnes du bureau Anne et Zineb, une sincère amitié s'est installée.

Je voudrais spécialement remercier Maryline. Tu es la première à avoir cru en moi. Merci parce que tu es l'une de ces personnes qui donnent confiance en soi.

Je termine en remerciant ma famille.

Mes parents, ma sœur, mes grands-parents, ma moitié, Kévan, Yolène et Laurie. De loin ou de près vous avez toujours été là, vous m'avez toujours soutenue. A toutes heures du jour ou de la nuit, peu importe le décalage horaire.

Un grand merci pour votre soutien moral mais aussi pour tout le temps que vous avez passé à m'aider à faire ce manuscrit. Maintenant vous êtes, vous aussi des experts en TYLCV et satellites « aux temps tardifs ».

Jess, Maman, Papounet, Yannick, Indi, je vous aime.

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	i
ABSTRACT.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIERES.....	vi
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	1
LISTE DES ABREVIATIONS.....	4
INTRODUCTION GENERALE.....	6
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
1. Définition et classification des satellites.....	9
2. Effet du satellite sur le virus assistant.....	10
2.1. Effets des satellites sur la pathogénie.....	10
2.2. Effets des satellites sur la fitness du virus.....	18
3. Facteurs impliqués dans le maintien d'un satellite par un virus.....	23
3.1. La réplication du satellite.....	23
3.2. La co-infection cellulaire.....	27
3.3. Le mouvement de cellule à cellule et à longue distance des satellites.....	29
3.4. La transmission.....	30
4. Un modèle d'étude original : le TYLCV et les satellites de begomovirus.....	31
4.1. Le TYLCV.....	31
4.2. Les satellites des begomovirus.....	35
5. Objectifs de la thèse.....	41
CHAPITRE I : ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES ADN DU TYLCV ET DES SATELLITES MAINTENUS DANS LES PLANTES AU COURS DU TEMPS.....	43
1. Introduction.....	43
2. Infectivité des satellites avec le CLCuGV et le TYLCV.....	45
2.1. Matériel et méthodes.....	47
2.2. Résultats.....	49
2.3. Discussion.....	51

3. Article 1: Assessing the capacity of <i>Tomato yellow leaf curl virus Mild strain</i> to maintain two alphasatellites and a betasatellite	54
4. Analyse qualitative des formes d'ADN viral et de satellites accumulées au cours de l'infection.....	87
4.1. Matériel et méthode.....	88
4.2. Résultats.....	90
4.3. Conclusion.....	102
5. Discussion.....	104
CHAPITRE II: COMPARAISON DE L'EFFET D'UN BETASATELLITE SUR DEUX SOUCHE DU TYLCV PRESENTES EN MEDITERRANEE (LE TYLCV MLD ET TYLCV-IL)	109
1. Contexte et objectif.....	109
2. Article 2 Differential impact of Cotton leaf curl Gezira betasatellite on within-host DNA accumulation of Israel and Mild strains of <i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	110
3. Comparaison des dynamiques d'accumulation du TYLCV-Mld, du TYLCV-IL et du CLCuGB dans la tomate entre 18 et 150 dpi.	133
4. Conclusion.....	135
CHAPITRE III: LOCALISATION CELLULAIRE DU TYLCV-MLD, DES SATELLITES BETA ET ALPHA PAR LA METHODE D'HYBRIDATION <i>IN SITU</i> EN FLUORESCENCE (FISH)	137
1. Introduction	137
2. Matériel et méthodes.....	139
2.1. Le matériel végétal, et les conditions d'inoculation	139
2.2. Quantification des ADN du virus et des satellites par qPCR.....	139
2.3. Préparation des sondes.....	139
2.4. Préparation des tissus.....	140
2.5. Détection et visualisation des cibles	141
2.6. Mise au point des conditions d'acquisition des images	141
3. Résultats.....	141
3.1. La spécificité des sondes.....	141
3.2. Identification des tissus infectés par le TYLCV et les satellites.....	143
3.3. Mise en évidence des différents profils d'infection au niveau cellulaire	143

3.4. Test de la corrélation de l'intensité des marquages TYLCV et satellite au niveau cellulaire.....	145
3.5. Fréquence de détection des différents profils d'infection dans les cellules infectées	145
4. Discussion.....	147
CHAPITRE IV : MISE AU POINT DES OUTILS POUR LE CALCUL DE LA MOI DU TYLCV	153
1. Introduction	153
2. Matériel et méthodes.....	155
2.1. Construction des variants de TYLCV.....	155
2.2. Infectivité des variants	157
2.1. Équicompetitivité des variants.....	159
2.2. Mise au point des sondes et observation au microscope confocal	159
3. Résultats.....	159
3.1. Mutagenèse des clones TYX.....	159
3.2. Spécificité des amorces de détection par qPCR	159
3.1. Infectivité des variants	161
3.2. Equicompetitivité des variants.....	161
3.3. Mise au point des sondes et observation au microscope confocale.....	161
4. Discussion et perspectives.....	163
CHAPITRE V : MISE AU POINT D'AMORCES GENERIQUES POUR LA DETECTION DE BETASATELLITES.....	165
1. Introduction	165
2. Matériel et méthodes : Définition du jeu de séquences de betasatellites.....	169
3. Résultats.....	171
3.1. Un jeu de séquences comportant beaucoup d'erreurs.....	171
3.2. Une grande diversité des effectifs pour chaque espèce.....	171
3.3. La capacité de détection des amorces de Briddon.....	171
3.4. Définition de nouvelles amorces universelles pour la détection des betasatellites	173
3.5. Le design des amorces pour les espèces du « out group »	175

4. Discussion et perspectives.....	175
DISCUSSION GENERALE.....	188
ANNEXE.....	194
BIBLIOGRAPHIE.....	199

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Les Tableaux

Tableau 1: Famille des virus à satellite.....	28
Tableau 2: Les fonctions des gènes du TYLCV (Glick et al., 2009; Wartig et al., 1997).....	32
Tableau 3: Caractéristiques de virus et satellites du Burkina Faso utilisés dans cette étude.....	44
Tableau 4: Résultat d'inoculation de virus et de satellite sur différentes plantes hôtes.....	46
Tableau 5 : Amorces et condition pour la PCR multiplexe pour la détection de CLCuGV et CLCuGB.....	46
Tableau 6: Taux de réussite d'inoculation de chaque combinaison.....	50
Tableau 7: Protocoles d'extraction d'ADN	52
Tableau 8: Amorces et conditions de PCR pour la mise en évidence des défauts.....	89
Tableau 9: Accumulation des ADN de TYLCV-IL, TYLCV-Mld et du CLCuGB dans les plantes inoculées entre 18 et 150 dpi.	134
Tableau 10: séquences des marqueurs insérés dans le génome du TYLCV	154
Tableau 11: séquences des amorces utilisées pour la mutagenèse.....	158
Tableau 12: séquences des amorces utilisées pour la détection par qPCR des variants.....	158
Tableau 13: Spécificité des amorces qPCR utilisées pour la détection des variants.....	158
Tableau 14: Taux d'inoculation.....	160
Tableau 15: Nombre de séquences de SCR de betasatellite, disponibles dans les bases de données en mai 2014.....	174
Tableau 16: Séquences éliminées car trop divergente des autres séquences de leur espèce dans la région SCR	178
Tableau 17: Polymorphisme nucléotidique de la SCR des betasatellites.....	180
Tableau 18: Séquences et caractéristiques des amorces conçues pour la détection de l'ensemble des betasatellites.	182
Tableau 19: Amorces non dégénérées correspondant aux séquences des SCR disponibles dans le jeu de 396 séquences.....	182
Tableau 20: Liste des betasatellites les plus divergents.....	184
Tableau 21: Séquences et caractéristiques des amorces conçues pour la détection des espèces divergentes du jeu de séquences et rassemblées dans l' « out group ».....	187

Les Figures

Figure 1: Classification des satellites	8
Figure 2: Organisation génomique du TYLCV..	32
Figure 3: La réplication des virus à ADN simple brin selon le mécanisme du cercle roulant. ..34	
Figure 4: Les satellites des begomovirus	36
Figure 5: Neighbor-joining phylogenetic dendrograms based on alignments of the complete nucleotide sequences of DNA 1 components).....	39
Figure 6: Symptômes provoqués par les différents traitements Virus-satellites.....	48
Figure 7: Les différentes conformations de l'ADN viral.....	86
Figure 8: Identification des profils migration des différentes formes d'ADN du TYLCV par Southern blot.	89
Figure 9: Identification des profils migration des différentes formes d'ADN du CLCuGB par Southern blot.	91
Figure 10: Analyse par Southern blot des ADNs du TYLCV	93
Figure 11: Analyse par Southern blot des ADN du TYLCV.....	95
Figure 12: Analyse par Southern blot des ADNs de CLCuGB	97
Figure 13: Analyse par Southern blot des ADN de CLCuGB	99
Figure 14: Analyse par Southern blot des ADNs de CLCuGA	99
Figure 15: Analyse par Southern blot des ADN de CLCuGB et de CLCuGA dans des extraits de tomates infectées 32, 90 et 150 jours après inoculation (dpi).	101
Figure 16: Amplification par PCR du génome total du TYLCV.	101
Figure 17: Amplification par PCR du génome total du CLCuGB.....	103
Figure 18: Amplification du génome total du CLCuGA par PCR.....	103
Figure 19: Alignement de la séquence de CLCuGB avec celle du clone séquencé à partir de tomate infectée depuis 32 dpi.....	105
Figure 20: Alignement de la séquence de CLCuGB avec celle du clone séquencé à partir de tomate infectée depuis 150 dpi.....	107
Figure 21 : Analyse par Southern blot des ADN du TYLCV et de CLCuGB dans les plantes utilisées lors du test de transmission	108
Figure 22: Dynamique d'accumulation des ADN de TYLCV-IL,TYLCV-Mld et de CLCuGB entre 18 et 150 jours post inoculation (dpi)	132

Figure 23: Schéma représentant d'une coupe longitudinale des éléments du phloème.	136
Figure 24: Les différentes étapes de préparation des échantillons pour l'étude de la localisation du TYLCV et des satellites par FISH.	138
Figure 25: Localisation au microscope confocal du TYLCV et des satellites par FISH dans des tissus de plante co-infectée par le TYLCV et un satellite.).	142
Figure 26: Relation entre l'intensité du marquage du TYLCV et des satellites dans les tissus co-infectés analysés à 18 et 32 dpi.	144
Figure 27 : Proportion de cellules infectées par le TYLCV le CLCuGA	146
Figure 28: Proportion de cellules infectées par le TYLCV, le CLCuGB	148
Figure 29: Obtention par mutagenèse dirigée des variants de TYLCV	156
Figure 30: Symptômes observés sur une feuille de tomate de la variété Monalbo infectée par le TYX (A) ou par Var1 (B) à 32 dpi.	160
Figure 31: Fréquence des variants dans les plants de tomates pour chaque traitement à 18 et 32 dpi.	162
Figure 32: Spectre d'absorption des fluorochromes Alexa488 (vert) et en d'Atto565 (rouge) en fonction de la longueur d'onde d'émission.	162
Figure 33 : Position des amorces de Briddon sur le génome de betasatellites.	166
Figure 34: Méthodologie suivit pour la mise au point des amorces.	168
Figure 35 : Méthodologie : Reverse complément des séquences de betasatellite	170
Figure 36 : Mise en évidence du mauvais appariement de l'amorce anti-sens de Briddon sur les séquences de 6 espèces de betasatellites. Beta01 est l'amorce sens ; beta 02 est l'amorce anti-sens.	172
Figure 37: Analyse phylogénétique de la SCR de 102 espèces de betasatellite.	176

LISTE DES ABREVIATIONS

Acronyme des virus et satellites

AAV	<i>Adeno-associated virus</i>
ACMV	<i>African cassava mosaic virus</i>
APMV	<i>Acanthamoeba polyphaga mimivirus</i>
ArMV	<i>Arabidopsis mosaic virus</i>
AYVB	<i>Ageratum yellow vein betasatellite</i>
AYVV	<i>Ageratum yellow vein virus</i>
BaMV	<i>Bamboo mosaic virus</i>
BWYV	<i>Beet western yellow virus</i>
BYDV	<i>Barley yellow dwarf virus</i>
BYVMV	<i>Bhendi yellow vein mosaic virus</i>
ChYMV	<i>Chicory yellow mottle virus</i>
CLCuD	<i>Cotton leaf curl disease</i>
CLCuMuB	<i>Cotton leaf curl multan betasatellite</i>
CLCuMV	<i>Cotton leaf curl multan virus</i>
CLCuV	<i>Cotton leaf curl virus</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CoMV	<i>Cocksfoot mottle virus</i>
CYDV	<i>Cereal yellow dwarf virus</i>
CymRSV	<i>Cymbidium ringspot virus</i>
EpYVV	<i>Eupatorium yellow vein virus</i>
FBNYV	<i>Faba bean necrotic yellows virus</i>
GRAV	<i>Groundnut rosette assistor virus</i>
GRV	<i>Groundnut rosette virus</i>
LTSV	<i>Lucerne transient streak mosaic virus</i>
MWLMV	<i>Maize white line mosaic virus</i>
PEMV	<i>Pea enation mosaic virus</i>
PMV	<i>Panicum mosaic virus</i>
PVX	<i>Potato virus x</i>
RYMV	<i>Rice yellow mottle virus</i>
SBMV	<i>Southern bean mosaic virus</i>
SCMoV	<i>Subterranean clover mottle virus</i>
SMWLMV	<i>Satellite du maize white line mosaic virus</i>
SNMV	<i>Solanum nodiflorum mottle virus</i>
SoMV	<i>Sowbane mosaic virus</i>

SPMV	<i>Satellite du Panicum mosaic virus</i>
STMGMV	<i>Satellite du tobacco mild green mosaic virus</i>
STNV	<i>Satellite du tobacco necrosis virus</i>
TbCSV	<i>Tobacco curly shoot virus</i>
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
TCV	<i>Turnip crinckle virus</i>
TGMV	<i>Tomato golden mosaic virus</i>
TMGMV	<i>Tobacco mild green mosaic virus</i>
TNV	<i>Tobacco necrosis virus</i>
ToLCCMV	<i>Tomato leaf curl Cameroon virus</i>
ToLCCNB	<i>Tomato leaf curl China betasatellite</i>
ToLCKV	<i>Tomato leaf curl Karnataka virus</i>
ToLCV	<i>Tomato leaf curl virus</i>
TRoV	<i>Turnip rosette virus</i>
TRSV	<i>Tobacco ringspot virus</i>
TYLCCNV	<i>Tomato yellow leaf curl China virus</i>
TYLCMLV	<i>Tomato yellow leaf curl Mali virus</i>
TYLCV	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
VTMoV	<i>Velvet tobacco mottle virus</i>

Abréviation courante

FISH : technique d'hybridation *in situ*

IR : Région intergénique

MOI : (multiplicity of cell infection) multiplicité d'infection cellulaire

RBE : Rep binding element

RCR : rolling circle replication

RDR : recombination dépendant répliation

SCR : Satellite Conserved Region

INTRODUCTION GENERALE

Les virus sont des micro-organismes intracellulaires qui utilisent la machinerie cellulaire de leur hôte pour pouvoir effectuer leur cycle de développement. La réplication virale, le contrôle des réactions de défense de l'hôte, le mouvement au sein de son hôte, et la transmission vers un nouvel hôte sont les étapes clés de la progression du développement viral. Dans la nature, les molécules de l'hôte et du virus intervenant à ces étapes profitent non seulement aux génomes fonctionnels, mais aussi à des génomes viraux non fonctionnels dits défectifs, et dans certains cas, à des génomes « étrangers » généralement appelés satellites.

Même si les génomes défectifs et les satellites ont une origine évolutive totalement différente, ces deux molécules partagent un point commun : leur maintien n'est possible qu'en association étroite avec un virus fonctionnel qui leur apporte en trans, les fonctions qu'elles ne sont pas capables d'assurer par elles-mêmes. Cependant, alors que les génomes défectifs peuvent être potentiellement néoformés dans chaque cellule infectée par le virus, la survie du satellite dépend entièrement de sa capacité à se maintenir en présence du virus assistant.

Outre quelques cas isolés de satellites décrits chez les animaux tels que l'Adeno-associated satellite virus (Parks et al., 1968) ou chez des amibes (La Scola et al., 2008), les satellites sont quasi-exclusivement décrits en association avec des virus de plantes.

Certains satellites ont la capacité de moduler les symptômes causés par leur virus assistant (Cui et al., 2004; Saunders et al., 2000 ; Saunders et al., 2004) et même d'augmenter sa gamme d'hôte (Saunders et al., 2002a). L'effet aggravant des satellites sur le pouvoir pathogène des virus de plantes a été l'une des principales motivations de leur étude.

Un des cas les plus graves de l'implication d'un satellite dans une épidémie virale est celui de la maladie de l'enroulement des feuilles de cotonnier (Cotton leaf curl disease, CLCuD). Il a été montré que le déterminant de cette maladie virale était le satellite cotton leaf curl Multan betasatellite (CLCuMuB) (Briddon et al., 2001) qui, en association avec différents begomovirus, provoquait la grave épidémie des années 1990 avec des pertes estimées à 1,3 millions de tonnes pour une valeur de 5 milliards de dollars (Mansoor et al., 1999).

Les satellites ont d'abord été considérés comme des parasites de virus qui, en compétition avec le virus pour la machinerie enzymatique virale, pouvaient entraîner une réduction de la synthèse virale, mais aussi de façon indirecte, une diminution des symptômes de la maladie sur leur plante hôte (Kaper and Tousignant, 1984). Il a été montré par la suite que dans certains cas, le virus pouvait également tirer bénéfice de cette association (Robinson et al., 1999; Zhang et al., 2012) et même que le satellite pouvait s'avérer indispensable pour l'infection de son hôte (Briddon et al., 2001; Cui et al., 2004; Saunders et al., 2000). En dehors de ces cas extrêmes où le bénéfice du satellite pour le virus est évident, on ne comprend pas encore très bien les

raisons pour lesquelles un satellite se maintient avec son virus assistant. La plupart des études menées sur les associations virus-satellites nous renseignent sur leurs conséquences agronomiques, mais la question du maintien n'a été que rarement abordée.

Dans le cadre de cette thèse la question du maintien de l'association virus satellite s'est posée de façon très concrète pour évaluer un risque sanitaire en relation avec l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). En effet, des résultats de la littérature ont montré que le Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), un virus dont les souches IL et Mld n'ont jamais été trouvées en association avec des satellites, pouvait facilement les transrépliquer avec une forte augmentation de la sévérité des symptômes viraux (Ito et al., 2009). Sachant que le TYLCV est déjà par lui-même un problème agronomique majeur de la culture de la tomate (Picó et al., 1996), l'association avec un satellite, qui le rendrait encore plus virulent, représente un risque pour les cultures. Le risque du maintien de cette association a été étudié à plusieurs niveaux : la réplication relative du virus et des satellites au cours du temps, leur co-infection cellulaire et la transmission des satellites par le vecteur naturel des begomovirus, *Bemisia tabaci*.

L'introduction du manuscrit se compose d'une présentation générale des satellites, de leur impact sur les virus assistants, des facteurs pouvant intervenir dans leur maintien avec un virus, et d'une description de notre modèle d'étude, le TYLCV. Dans le premier chapitre, nous décrivons la dynamique d'accumulation du TYLCV et de trois satellites chez la tomate et leur transmission par *Bemisia tabaci* (article 1). Dans le chapitre 2, nous comparerons l'effet d'un satellite sur les deux souches méditerranéennes de TYLCV (article 2). Dans le chapitre 3 nous observerons la localisation cellulaire du TYLCV et des satellites à l'aide d'une technique d'hybridation *in situ* (FISH). Dans le chapitre 4 nous chercherons à évaluer la multiplicité d'infection cellulaire du TYLCV (MOI), un paramètre qui pourrait être déterminant dans le maintien de son association avec des satellites. Enfin dans le chapitre 5, nous présenterons la méthodologie ayant permis de définir des amorces pour la détection générique des betasatellites ; ces amorces sont destinées au contrôle des introductions sur le territoire.

Dans la discussion générale nous avons cherché à voir comment les résultats obtenus sur la base d'une association expérimentale virus-satellite pouvaient apporter un éclairage nouveau sur la question du maintien des associations en conditions naturelles.

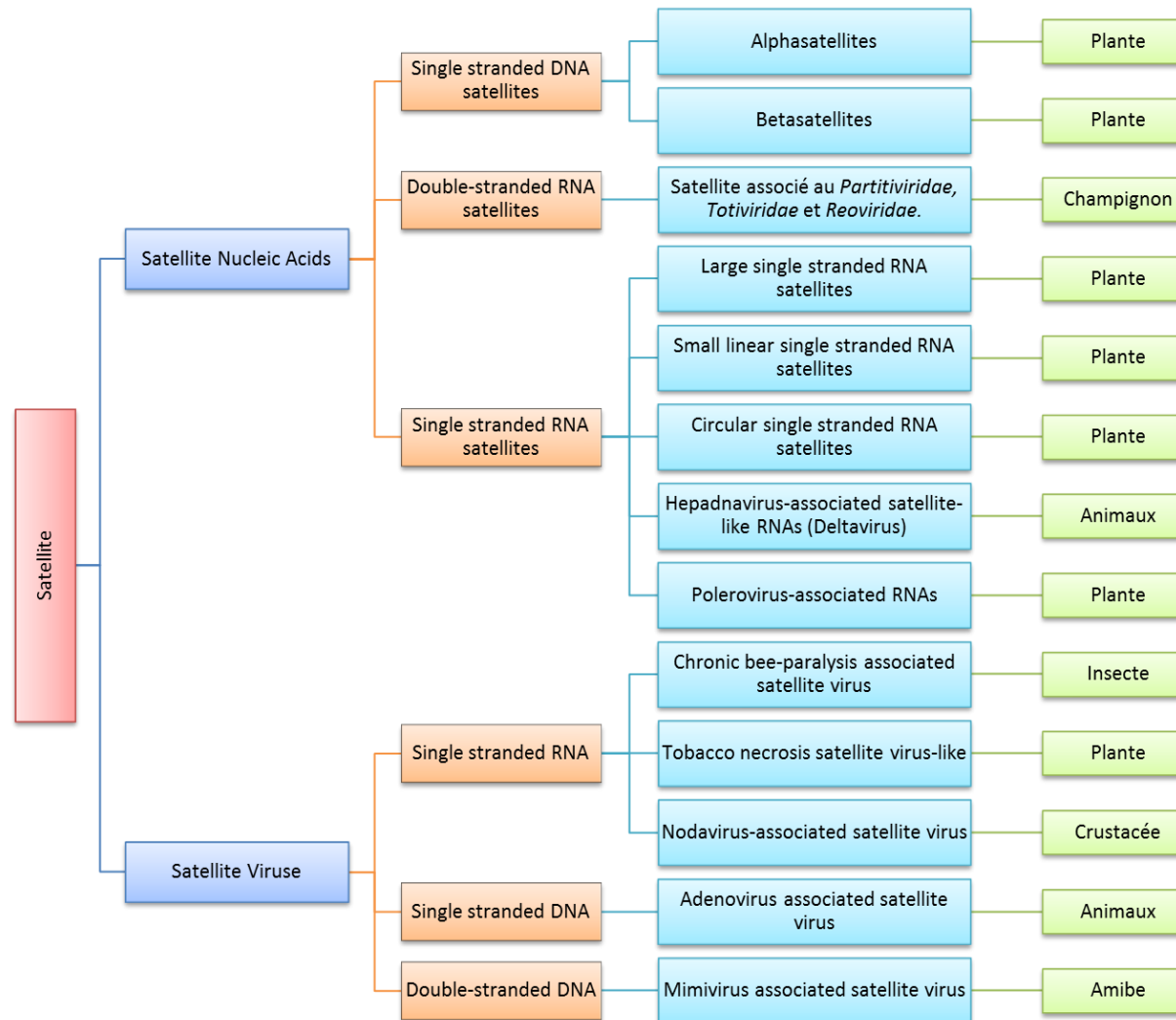


Figure 1: Classification des satellites.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. Définition et classification des satellites

Le terme "satellite virus" a été utilisé pour la première fois en 1962 par Kassanis pour décrire un petit virus de plante dépendant du tobacco necrosis virus (TNV) pour sa multiplication (Kassanis, 1962). Depuis, le terme «satellite» a été très largement utilisé dans la sphère des virologues. Pour l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), les satellites sont des agents qui s'avèrent déficients pour les gènes codants pour des fonctions nécessaires à la réplication ; ils dépendent d'un virus assistant pour leur multiplication (Briddon et al., 2012). On les différencie des génomes défectifs de virus car les séquences nucléotidiques des satellites ne présentent pas ou très peu d'homologie avec celles de leur virus assistant et de leur hôte.

L'ICTV distingue 2 classes de satellites. Les « virus-satellites » qui codent pour leur propre protéine de capsid et les « acides nucléiques satellites » qui dépendent du virus assistant pour leur encapsidation car ils ne codent pour aucune protéine structurale (Murant and Mayo, 1982 ; Hu et al., 2009). A l'intérieur de chacun de ces groupes, les satellites sont classés sur la base de la nature de leur génome qui peut être de type ARN ou ADN, simple ou double brin (Figure 1).

Cette définition restreinte des satellites est souvent élargie à de nombreuses exceptions. En plus des satellites dits « vrai », il existe d'autres agents qui interagissent avec le virus assistant pour des fonctions autres que la réplication. Ainsi, les « acides nucléiques satellite-like » dépendent du virus assistant pour la réplication mais codent pour une fonction nécessaire au virus assistant. C'est par exemple le cas de l'ARN satellite associé au groundnut rosette virus (GRV) qui est indispensable à la transmission par puceron de son virus assistant (Robinson et al., 1999). De même des satellites de type betasatellites sont indispensables à certains begomovirus pour une infection efficace et symptomatique de l'hôte (Kon et al., 2009; Saunders et al., 2000; Briddon et al., 2001). Il existe aussi des agents qui sont autonomes pour leur réplication mais qui dépendent du virus assistant pour d'autres fonctions. C'est le cas par exemple des alphasatellites associés à certains begomovirus (Briddon et al., 2004) ou de l'ARN satellite du polerovirus beet western yellow virus (BWYV), souche ST9 (Passmore et al., 1993) ; ils dépendent du virus assistant pour leur encapsidation, leur mouvement à courte et longue distance et leur transmission.

Les satellites ne forment donc pas un groupe taxonomique homogène. Pour alléger l'écriture du manuscrit, a été considéré comme satellite, tout agent qui dépend d'un virus dit assistant pour l'une au moins de ses fonctions vitales (réplication, encapsidation, transmission vers un nouvel hôte...), et qui partage peu ou pas d'homologie de séquence avec le virus assistant.

Les satellites ont été décrits avec des virus de l'ensemble des règnes du vivant, mais la grande majorité des satellites a été décrite avec des virus de plantes. Ce qui est commun à tout

satellite et qui le définit, c'est l'assistance indispensable que lui apporte le virus assistant. A l'inverse il serait bien difficile de dire d'une façon générale le bénéfice, si tant est qu'il y en ait, qu'apporte le satellite au virus ; chaque satellite semble être un cas particulier et dans de nombreux cas cette question n'a pas été abordée. C'est pourtant un élément important pour tenter de comprendre comment une association virus-satellite peut se maintenir au cours du temps. C'est la raison pour laquelle je propose d'examiner parmi les associations virus-satellites les plus étudiées, l'effet du satellite sur le virus et si possible de discerner si l'effet est potentiellement positif, neutre ou négatif sur la valeur sélective du virus.

2. Effet du satellite sur le virus assistant

Selon le degré de connaissance des satellites et la nature variée des recherches dont ils ont fait l'objet (pathologie, évolution génomique, mécanisme de réplication, ultrastructure des virions, etc.) la question du bénéfice qu'ils apportent au virus assistant a été plus ou moins abordée.

2.1. Effets des satellites sur la pathogénie

La grande majorité des satellites est connue pour moduler les symptômes causés par le virus assistant. L'effet d'un satellite sur la pathogénie dépend non seulement du satellite, mais aussi de la souche virale et de l'espèce hôte. Pour la plupart des ARNs satellites, il s'agit d'une atténuation des symptômes, une propriété qui a suscité un intérêt pour l'utilisation de ces satellites dans le contrôle des maladies (Collmer and Howell, 1992). Certains satellites augmentent cependant la sévérité des symptômes.

Nous allons voir quelques exemples de modulation de symptômes parmi les modèles de satellites les plus étudiés.

2.1.1. Les ARNs satellite du cucumber mosaic virus (CMV, genre *Cucumovirus*, famille *Bromoviridae*)

Les ARNs satellites du CMV ont été les satellites les plus étudiés. Leur première description a été faite à la suite d'un travail d'étiologie sur une épidémie de nécrose de la tomate en Alsace (Marrou et al., 1973). Depuis, plus d'une centaine de satellites ont été décrits en association avec le CMV qui est un des virus les plus répandus au monde. Le CMV infecte plus de 1200 espèces de plantes et est transmis efficacement par plus de 75 espèces de pucerons (Kouadio et al., 2013). Les ARNs satellites des cucumovirus appartiennent à la catégorie des petits ARNs linéaires de plantes, généralement inférieurs à 700nts ([Figure 1](#)). Ils ont un génome de 330 à 450 nts portant une coiffe en 5' mais n'ont pas d'activité messager. Ils présentent une forte structure secondaire avec 50% de nucléotides (nt) appariés et ne présentent pas ou très peu d'homologie avec leur virus assistant. Il existe 2 variants naturels qui ont des propriétés biologiques bien différenciées selon les symptômes qu'ils provoquent chez la tomate. La plupart des ARNs satellites du CMV sont dits non-nécrogènes car ils atténuent l'expression des symptômes du virus assistant alors que d'autres sont dits nécrogènes en raison des

sévères nécroses et chloroses qu'ils induisent chez la tomate (Kaper and Waterworth, 1977). Cet effet des satellites sur la pathogénie de leur virus assistant dépend aussi de l'espèce hôte et de la souche du virus assistant (Collmer and Howell, 1992). Par exemple, il a été montré que le satRNA D qui provoque des symptômes de nécroses sur tomate en présence du CMV, atténue les symptômes du CMV sur tabac (Kouadio et al., 2013). La réplication des ARNsat induit généralement une réduction de l'accumulation des ARNs du CMV (Palukaitis and García-Arenal, 2003). Il a été suggéré que la réduction de l'accumulation du CMV pouvait être à l'origine de l'atténuation des symptômes. Ce n'est cependant pas une règle générale car il a été montré que des ARNs satellites qui induisent des nécroses sur tomate ont également un impact négatif sur l'accumulation du CMV et cet impact peut même être supérieur à celui des satellites non nécrogènes (Escriu et al., 2000a).

Un domaine situé dans la partie 3' terminale du satellite a été identifié comme un déterminant de la propriété nécrogène du satellite même si d'autres régions, en dehors de ce domaine, influencent l'intensité de la nécrose (Palukaitis and García-Arenal, 2003). L'expression d'un ARN satellite nécrogène dans une tomate transgénique n'induit pas le symptôme de nécrose en l'absence de CMV (McGarvey et al., 1990). Par contre l'expression de l'ARN satellite à partir d'un vecteur viral (potato virus X, PVX) induit les symptômes de nécrose en absence du CMV (Taliany et al., 1998).

Comme le CMV est un virus d'importance économique mondiale, diverses méthodes ont été proposées pour contrôler ce pathogène. Les travaux pionniers de Mireille Jacquemond (INRA, Avignon) ont montré qu'une pré-inoculation de la tomate, par un isolat de CMV et un ARNsat non nécrogène, lui permettait de bénéficier d'un effet protecteur contre les attaques d'une souche sévère de CMV (avec ou sans ARNsat nécrogène) (Jacquemond and Leroux, 1982). Divers essais en serre et au champ ont confirmé le potentiel de la pré-inoculation avec des satellites non-nécrogènes pour atténuer les attaques de CMV. Des résultats concluants ont également été obtenus avec des plants transgéniques exprimant des ARNsat. Jacquemond et al. (1988) ont montré que l'expression monomérique du transgène dans le tabac était suffisante pour assurer une protection et que des plantes présentant différents niveaux d'expression du transgène, exprimaient un niveau de protection comparable (Jacquemond et al., 1988).

2.1.2. Les ARNs satellites des virus du genre *Tombusvirus* (Famille *Tombusviridae*)

Comme les ARNs satellites des cucumovirus, les ARNs satellites associés au virus du genre *Tombusvirus* appartiennent à la catégorie des petits ARNs linéaires, généralement inférieurs à 700nts (Figure 1). Les ARNs satellites B1 (822nt) et B10 (613 nt) ont été détectés en présence du tomato bushy stunt virus (TBSV), un virus détecté en Europe et en Amérique Latine. Un ARN satellite de 619nt a été détecté avec le cymbidium ringspot virus (CymRSV), un virus détecté au sud de l'Angleterre. Ces ARNs satellites ne semblent pas avoir d'activité de messenger. Leur identité nucléotidique avec le virus assistant est réduite à une région de 50 nt

internes (Celix et al., 1997) mais des homologies ont été détectées au niveau de structures secondaires (Chernysheva and White, 2005). L'ARNsat B10 atténue les symptômes du TBSV dans *Nicotiana clevelandii* alors que l'ARNsat B1 ne modifie pas les symptômes (Célix et al., 1999). Par ailleurs il a été montré que des ARNs satellites du TBSV et du CymRSV ont pour effet de diminuer le nombre des lésions locales induites par le TBSV sur *Chenopodium amaranticolor*.

2.1.3. Les ARNs satellite du Turnip crinkle virus (genre *Carmovirus*, famille *Tombusviridae*)

Des ARNs satellites au sein de la famille *Tombusviridae*, ne se limitent pas à des virus du genre *Tombusvirus* car de tels ARNs ont également été identifiés chez au moins un virus du genre *Carmovirus*, à savoir, le turnip crinkle virus (TCV). Contrairement au CMV dont la distribution est mondiale, le TCV n'a été détecté qu'en Europe. Tout comme les ARNs satellites des autres tombusvirus, les ARNs satellites du TCV appartiennent également à la catégorie des petits ARNs linéaires (Figure 1). Le TCV assiste des satellites tels que l'ARNsat D (230 nts) qui n'a pas d'effet détectable sur la réplication et les symptômes du TCV et des satellites issus de la recombinaison entre l'ARNsat D et le TCV tels que l'ARNsat C (356 nts) qui diminue l'accumulation du virus assistant tout en amplifiant ses symptômes (Simon et al., 2004). Le SatC contient deux régions dérivées du génome du TCV. La modulation des symptômes dépend de l'hôte (Li and Simon, 1990). Dans les hôtes où l'infection par le TCV n'est pas associée à des symptômes, la présence de l'ARNsat C n'a aucun effet sur la symptomatologie de la plante (Li and Simon, 1990). A l'inverse, chez les plantes qui développent des symptômes en réponse à l'infection du TCV, les symptômes sont renforcées par l'addition du satellite. Contrairement aux ARNsat nécrogènes du CMV qui induisent eux-mêmes les symptômes de nécrose chez la tomate, l'ARNsat C du TCV ne fait qu'amplifier les symptômes de son virus assistant. Le phénomène d'amplification des symptômes serait lié à un effet positif de l'ARNsat C sur le mouvement de cellule à cellule et le mouvement à longue distance du virus qui sera explicité ci-dessous.

2.1.4. Les ARNs satellites des virus du genre *Nepoviruses* (famille *Secoviridae*)

Les ARNs satellites des népovirus appartiennent à deux catégories, les grands ARNs satellites linéaires (0,7 – 1,5 kb) et les petits ARNs satellites circulaires de moins de 0,4 kb (Collmer and Howell, 1992; Hu et al., 2009). Les petits ARNs satellites circulaires modulent les symptômes de leur virus assistant. Le premier décrit est l'ARNsat du tobacco ringspot virus (TRSV), un virus endémique en Amérique du Nord mais qui a été détecté dans beaucoup d'autres régions du monde. L'ARN satellite du TRSV réduit la taille et le nombre de lésions locales induites par son virus assistant sur son hôte. Cet effet d'atténuation des symptômes a également été observé avec des tabacs transformés avec un cDNA multimérique de l'ARNsat. L'ARNsat du chicory yellow mottle virus (ChYMV), un virus identifié dans le sud de l'Italie, atténue les symptômes de son virus assistant sur *Nicotiana tabacum* Xanthi et sur *N. glutinosa*.

Contrairement aux ARNsats du TRSV et du ChYMV qui atténuent les symptômes de leur virus assistant, l'ARNsat de l'Arabidopsis mosaic virus (ArMV), un virus identifié en Europe, aggrave les symptômes de l'ArMV chez *Chenopodium quinoa* et le houblon. Les ARNsats du TRSV, du ChYMV et de l'ArMV présentent des homologies de séquences mais on ne connaît pas quelles sont les interactions virus/satellite/plante-hôte qui expliquent que les uns atténuent la sévérité des symptômes et que l'ARNsat de l'ArMV l'aggrave.

Les ARNs satellites de grande taille (1,1 – 1,4 kb) n'ont que peu ou pas d'effet sur les symptômes causés par leur virus assistant. Ces ARNs satellites qui ressemblent à leur virus assistant, avec une queue polyadénylée en 3' et une protéine VPg liée du côté 5' codent pour une protéine de 38 à 48 kDa. Ces protéines n'ont que peu d'homologie entre les différents ARNs satellites et aucun motif peptidique remarquable n'a été identifié. Cependant, les résultats obtenus par génétique inverse suggèrent que la protéine codée par ces satellites est essentielle pour la multiplication du satellite (Fritsch et al., 1993). De plus, il a été montré avec un isolat lilas de l'ArMV sur une gamme de 42 espèces/cultivars, qu'un ARN satellite de grande taille pouvait moduler les symptômes de son virus assistant sur certains hôtes. Alors que son effet était neutre pour la plupart des plantes, la sévérité des symptômes était aggravée pour trois espèces de légumes mais atténuée sur des plantes issues de cinq familles (Liu et al., 1991)..

2.1.5. Les ARNs satellites des virus du genre *Sobemovirus*

Tous les ARNs satellites décrits chez les sobémovirus appartiennent à la catégorie des petits ARNs circulaires. C'est le cas de plusieurs sobémovirus australiens, le lucerne transient streak mosaic virus (LTSV), le velvet tobacco mottle virus (VTMoV), du solanum nodiflorum mottle virus (SNMV), le subterranean clover mottle virus (SCMoV) (Sehgal et al., 1993), et le sobémovirus africain du riz, le rice yellow mottle virus (RYMV) (Collins et al., 1998). Outre ces quelques cas d'associations, la plupart des sobémovirus sont apparemment dépourvus d'ARNs satellites, tels que le cocksfoot mottle virus (CoMV) détecté en Angleterre, le turnip rosette virus (TRoV) détecté en Ecosse, le southern bean mosaic virus (SBMV) détecté en Amérique, en Afrique, en France et en Inde, et le sowbane mosaic virus (SoMV) qui a une distribution mondiale.

Il n'y a que peu de données sur l'influence des ARNs satellites sur la pathogénie des sobémovirus. Cependant une étude remarquable avec le modèle LTSV montre que la présence du satellite augmente la sévérité des symptômes, le LTSV seul induisant des lésions chlorotiques alors qu'en co-infection avec l'ARN satellite, il induit des lésions nécrotiques (Jones et al., 1983).

2.1.6. Les ARNs satellites des virus du genre *Polerovirus* (famille *Luteoviridae*)

Les ARNs satellites associés polérovirus appartiennent à plusieurs catégories notamment à celle des petits ARNs circulaires et à celle des grands ARNs satellites linéaires, et (Figure 1).

Un petit ARN circulaire de 322 nts a été trouvé en association avec le cereal yellow dwarf virus (CYDV), anciennement appelé souche RPV du barley yellow dwarf virus (BYDV). Comme tous les ARNs satellites de sa catégorie, il semble ne coder pour aucune protéine. L'ARN satellite atténue la sévérité des symptômes du CYDV sur avoine (Rasochova and Miller, 1996). L'assistance qu'apporte le CYDV à l'ARN satellite paraît relativement spécifique car la souche PAV du BYDV, un autre membre de la famille *Luteoviridae* mais appartenant au genre *Luteovirus*, n'a pas pu assister ce satellite en conditions expérimentales. La co-infection de plantes d'avoine avec le CYDV et le BYDV provoque des symptômes plus sévères que l'infection avec CYDV seul. En ajoutant l'ARN satellite à ce mélange, les symptômes de co-infection ne sont pas atténués ce qui semble indiquer que l'atténuation des symptômes du CYDV ne serait pas liée à un déclenchement de réaction de défense de la plante mais plutôt à un effet négatif sur l'accumulation virale ; l'accumulation du CYDV est en effet drastiquement diminuée par la présence du satellite en plante mais aussi en protoplaste.

Les ARNs encapsidés par la souche ST9 du *beet western yellows virus* (BWYV) ne contiennent pas uniquement l'ARN génomique de 5,6 kb caractéristique des polérovirus, mais aussi un ARN de 2843 nts qui code pour trois cadres de lecture ouverts (ORF).

Les symptômes observés sur *Capsella bursa-pastoris* infectée par la souche ST9 sont plus sévères que les symptômes provoqués par d'autres souches de BYWV telle que la souche L-1 qui n'ont pas le satellite ST9. Grâce au système d'acquisition de virus par pucerons sur protoplaste, il a été montré que la souche BWYV-ST9 sans le satellite provoque des symptômes atténués et que la souche L-1 co-inoculée avec le satellite ST9 induit des symptômes sévères. Ces expériences montrent de façon éloquent que le satellite ST9 est responsable des symptômes sévères de la souche ST9 du BYWV (Sanger et al., 1994).

2.1.7. L'ARN satellite du Bamboo mosaic virus (genre *Potexvirus*)

Le bamboo mosaic virus (BaMV) a été découvert pour la première fois au Brésil (Lin, 1977) mais les isolats les plus étudiés par la suite, et avec lesquels un ARN satellite a été découvert, provenaient de Taiwan (Lin, 1992; Lin and Hsu, 1994).

Le BaMV est apparemment le seul potexvirus qui a été trouvé avec un ARN satellite. Le génome du BaMV est un ARN positif de 6366 nts qui code pour cinq ORFs conservés. Le génome du satBaMV est un ARN de 836 nt qui code pour une protéine de 20kD présentant des homologues avec la CP du virus satellite du panicum mosaic virus (PMV). Cette protéine n'est pas nécessaire pour la réplication (Lin et al., 1996) mais elle se lie préférentiellement à l'ARN satellite du BaMV (Tsai et al., 1999). Ce qui suggère une implication dans son mouvement. L'ARN satellite est tributaire du virus assistant pour sa réplication. En présence

de l'ARN satellite, l'accumulation du BaMV et les symptômes qu'il induit sur la plante sont réduits par rapport à une infection en absence de satellite.

2.1.8. Les ARNs satellites du groundnut rosette virus (genre *Umbravirus*)

Les Umbravirus sont des virus à ARN de polarité positive dont l'originalité tient au fait qu'ils ne codent pour aucune protéine de capsid. Leur transmission de plante à plante nécessite un virus assistant, généralement de la famille des *Luteoviridae*, qui leur procure une CP. Parmi les maladies à Umbravirus, la Rosette est certainement la plus connue car c'est la maladie virale la plus destructive de l'arachide en Afrique. Les attaques sont imprévisibles et peuvent provoquer de très importantes pertes. En 1975, 0.7 millions d'hectare (ha) d'arachide ont été infectés au Nigéria avec des pertes estimées à 0.5 millions de tonnes pour une valeur de 250 millions de dollars. En 1995, environ 43000 ha ont été touchés en Zambie avec des pertes estimées à 5 millions de dollars.

Le groundnut rosette virus (GRV) est l'umbravirus responsable de la Rosette et sa CP lui est procurée par le Groundnut rosette assistant virus (GRAV, famille *Luteoviridae*). Le GRV a une originalité supplémentaire par rapport aux autres umbravirus ; il ne peut utiliser la CP de son virus assistant qu'en présence d'un ARN satellite. Ceci a été montré avec des plantes transgéniques de *N. benthamiana* exprimant la CP de GRAV. Ce n'est qu'avec ce ménage à trois que le GRV peut être transmis par le puceron *Aphis craccivora* selon le mode circulant non multipliant (Robinson et al., 1999).

Les ARNs satellites du GRV ont une taille comprise entre 895 et 903 nts et ont besoin du GRV pour leur réplication. Les différents variants d'ARN satellites du GRV contiennent jusqu'à cinq ORFs possibles mais aucun de ces ORFs ne semblent nécessaires pour aucune des fonctions connues des ARNs satellites. L'ARN satellite est responsable des symptômes car une infection avec GRAV seul n'induit aucun symptôme, une infection avec GRV seul produit des symptômes transitoires de mouchetures à peine visibles et il a été montré par des inoculations artificielles de différents isolats de GRV, que les ARNs satellites sont responsables des formes communément observées de la maladie de la Rosette.

Le pea enation mosaic virus (PEMV) est un autre umbravirus trouvé avec un ARN satellite mais il n'a pas besoin de l'assistance du satellite pour sa transencapsidation. Le PEMV peut transrépliquer l'ARN satellite du GRV dans l'arachide en provoquant les symptômes typiques de Rosette ce qui confirme que le satellite est bel et bien responsable des symptômes. Deux régions non contiguës de l'ARN satellite sont impliquées ensemble dans l'induction des symptômes (Demler et al., 1996).

2.1.9. Les ADN satellites des virus à ADN

Deux types de satellites ont été décrits en association avec les begomovirus, les alphasatellites et les betasatellites. Comme le génome de leur virus assistant, leur génome est constitué d'ADN simple brin circulaire. Par contre, alors que la taille du ou des composants génomiques des begomovirus monopartite ou bipartite est d'environ 2.6 kb, la taille des ADN satellites est environ de moitié. Les betasatellites induisent très souvent une augmentation de la gravité des symptômes causés par leur virus assistant. Comme pour les ARNs satellites du CMV qui peuvent induire par eux même des symptômes, il a été montré par transgénése que la protéine betaC1 induit par elle-même des symptômes (Cui et al., 2005a, 2005b).

Outre quelques rares exceptions, les alphasatellites ne modifient pas la pathogénie de leur virus assistant. On note cependant que les symptômes causés par le tobacco curly shoot virus (TbCSV) (seul ou avec un betasatellite dans *N. benthamiana*) sont atténués en présence d'un alphasatellite (Wu and Zhou, 2005). Des ADN satellites ont également été décrits en association avec des virus du genre *Nanovirus*, des virus dont le génome est constitué de six à huit segments d'ADNs circulaires simples brin d'environ 1kb encapsidés séparément. Ils sont parfois associés à des ADN satellites de type paraRep qui sont, comme les alphasatellites, autonomes pour leur réplication mais qui ont besoin du virus assistant pour leur mouvement et leur transmission de plante à plante. Il semblerait que la sévérité des symptômes du faba bean necrotic yellows virus (FBNYV) soit négativement corrélée à la présence de composants paraRep aux champs ainsi que lors d'infections artificielles (Timchenko, 2006).

2.1.10. Les virus satellites de plantes

Contrairement aux ARNs ou ADN satellites, les virus satellites codent pour leur protéine de capside. Par contre ils sont tributaires du virus pour d'autres fonctions et notamment la réplication de leur génome. Quatre virus satellites ont été décrits chez les plantes ; ils sont assistés par les virus suivants:

- Le satellite du maize white line mosaic virus (SMWLMV) assisté par le maize white line mosaic virus (MWLMV), un virus icosahédrique du genre *Aureusvirus* (famille *Tombusviridae*) (Zhang et al., 1991)
- Le satellite du tobacco necrosis virus (STNV) assisté par le tobacco necrosis virus (TNV), un virus icosahédrique de la famille *Tombusviridae* (Bringloe et al., 1998)
- Le satellite du panicum mosaic virus (SPMV) assisté par le panicum mosaic virus (PMV), un virus icosahédrique du genre *Panicovirus* de la famille *Tombusviridae* (Scholthof, 1999)

- Le satellite du tobacco mild green mosaic virus (STMGMV ou STMV) assisté par le tobacco mild green mosaic virus (TMGMV, anciennement souche U2 du TMV), un virus en bâtonnet du genre *Tobamovirus* de la famille *Virgaviridae*. (Dodds, 1998)

Ces virus satellites sont des virus icosahédriques de petite taille, 17 nm de diamètre, qui ont suscité un vif intérêt pour des études structurales de leurs particules virales et de leur ARN. Des structures à très haute résolution ont été obtenues pour le STMV (1.8Å) et pour le STNV (2.5Å). Il est d'ailleurs intéressant de noter dans le contexte de cette thèse qui se focalise sur un modèle géminivirus que la première structure pseudo atomique d'une protéine de capsid d'un géminivirus a été proposée par comparaison avec la structure 3D du STNV. (Ford et al., 2013; Jones et al., 1983; Kuznetsov et al., 2010).

Les virus satellites ont été rarement décrits comme pouvant moduler les symptômes causés par le virus assistant. On note cependant une forte augmentation de la gravité des symptômes du PMV en présence du SPMV. Les symptômes légers causés par le PMV sur son hôte naturel *Stenotaphrum secundatum*, sont aggravés par la présence du SPMV en produisant un symptôme sévère de mouchetures chlorotiques. De même, alors que le PMV seul ne provoque que de légères mouchetures sur mil (pearl millet), la co-infection avec le SPMV provoque une chlorose sévère et du rabougrissement (Scholthof, 1999).

L'expression de la CP du SPMV dans le vecteur PVX induit des lésions nécrotiques sur *N. benthamiana* qui n'est pas un hôte du PMV, ce qui montre que l'augmentation de la gravité des symptômes est un effet direct du satellite comme dans le cas des satellites nécrotiques du CMV ou du betasatellite des begomovirus (Qiu and Scholthof, 2004).

Les essais d'inoculation en conditions contrôlées du TMV avec le STMV n'ont généralement pas révélé de modulation de symptôme sauf sur piment où sa présence augmente les chloroses que provoque le TMGMV seul en induisant des taches foliaires de couleur jaune brillant (Alvarado, 1994).

2.1.11. Les virus satellites trouvés chez des hôtes qui ne sont pas des plantes

Dans la catégorie des satellites associés à des hôtes autres que les plantes, une catégorie relativement restreinte par rapport à celle des satellites des phytovirus, nous n'en citerons que deux, probablement les plus remarquables : un virus satellite de l'adénovirus (un virus animal), et le virus satellite « sputnik » trouvé en association avec la souche mamavirus de l'*Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV), un virus géant de protozoaire appartenant à un groupe décrit tout récemment dans l'amibe *Acanthamoeba polyphaga*.

Le virus satellite associé à des adénovirus, communément appelé AAV pour « adeno-associated virus » appartient au genre *Dependovirus* dans la famille *Parvoviridae* (Gonçalves, 2005). Ce virus est considéré comme un satellite car il a besoin d'un virus assistant pour sa réplication. L'AAV est un des plus petit virus avec une capsid isométrique non enveloppée de 22 nm de diamètre. Son génome est un ADN simple brin linéaire de 4,7 kb qui code pour

une protéine structurale et deux protéines non structurales. Comme le SNTV et le STMV, ce virus a suscité l'intérêt des structuralistes qui ont déterminé sa structure avec une résolution de 3 Å (Xie et al., 2002).

En dépit de sa forte séroprévalence dans la population humaine, (environ 80% des individus sont séropositifs pour l'AAV2), ce satellite n'a été relié à aucune maladie humaine (Gonçalves, 2005), ce qui semble indiquer qu'il n'aggrave pas les symptômes causés par ses virus assistants. Si l'AAV co-infecte une cellule avec un virus assistant tel qu'un adénovirus ou un herpès simplex virus, il rentre dans un cycle lytique. Par contre, s'il rentre dans une cellule humaine en absence de virus assistant, l'expression de ses gènes est réprimée et l'AAV rentre dans une phase de latence avec une intégration de son génome préférentiellement dans une région d'environ 2kb du bras long du chromosome 9. Pour toutes ces raisons l'AAV a acquis une grande renommée pour son potentiel en thérapie génique.

Le virus satellite sputnik a été isolé à Paris dans l'eau d'une tour de refroidissement en association avec la souche mamavirus de l'APMV (La Scola et al., 2008). C'est un virus icosaédrique de 50 nm avec un génome à ADN double brin circulaire de 18,3 kb qui code pour 21 protéines putatives. Sputnik n'a pu être répliqué expérimentalement dans l'amibe qu'en présence de la souche mamavirus avec laquelle il a été isolé, ou en présence de la souche type de l'APMV isolée dans des amibes présentes dans l'eau d'une tour de refroidissement et récupérée en 1992 à Bradford en Angleterre (La Scola et al., 2003). Le virus satellite sputnik réduit les « symptômes » de l'APMV car en sa présence, la lyse des amibes est réduite de trois fois, 24h après inoculation.

2.2. Effets des satellites sur la fitness du virus

Alors que les satellites sont parfois considérés comme des parasites pouvant représenter un fardeau pour le virus, une étude plus fine des interactions virus/satellite révèle que certains satellites, que l'on pourrait considérer à priori comme parasites, ont des propriétés potentiellement bénéfiques à la fitness du virus assistant.

2.2.1. Effets bénéfiques

On peut tout d'abord mentionner les cas suivants où le satellite est incontestablement bénéfique du simple fait qu'il est indispensable ou quasi indispensable à la propagation du virus assistant.

Dans le cas de l'umbravirus GRV, l'ARN satellite est indispensable pour la transmission du GRV de plante à plante. Cette dépendance vient du fait que le GRV ne peut s'encapsider dans la CP du GRAV qu'en présence de l'ARN satellite du GRV (Robinson et al., 1999) et que cette encapsidation est nécessaire pour la transmission par puceron. Comme le GRV n'est pas transmis par semence et que l'arachide n'est pas une plante pérenne, on comprend que le GRV a été fatalement trouvé en association avec le satellite.

Une autre association dans laquelle le virus assistant ne peut pas se passer de son satellite est celle de certains begomovirus tels que l'ageratum yellow vein virus (AYVV) ou le cotton leaf curl virus. En absence de betasatellite, l'infection systémique de l'hôte naturel, ageratum conzoides ou le coton (*Gossypium*) est sporadique et asymptomatique et l'accumulation du génome viral est réduite à 5% ou même moins par rapport à son accumulation en présence du satellite (Saunders et al., 2000; Briddon et al., 2001). Une telle association étroite avec un betasatellite a également été décrite pour le bhendi yellow vein mosaic virus (BYVMV), l'eupatorium yellow vein virus (EpYVV), et pour le tomato yellow leaf curl china virus (TYLCCNV). Il a été montré pour ce dernier que le betasatellite avait un rôle dans le contournement du silencing (Cui et al., 2005a), le mouvement de cellule à cellule ainsi que le mouvement à longue distance du virus assistant. Ces propriétés sont bien illustrées par une expérience intéressante dans laquelle le composant B d'un virus bipartite (cassava mosaic virus), spécialisé dans les fonctions de mouvement, a pu être remplacé par un betasatellite qui a pu assurer l'infectivité et les fonctions de mouvement du composant A (Patil and Fauquet, 2010). De même, le CLCuMuB peut également assurer le mouvement du composant A du tomato leaf curl New Dehli virus (ToLCNDV) en l'absence du composant B (Saeed et al., 2007).

Outre les cas d'association obligatoire ou quasi obligatoire que nous venons de décrire où le satellite est incontestablement bénéfique à la propagation du virus, des satellites non indispensables peuvent également manifester des propriétés potentiellement bénéfiques au virus assistant comme illustré dans les exemples suivants.

Dans le cas des begomovirus pour lesquels l'association avec les betasatellites est facultative pour l'établissement d'une infection efficace avec leur hôte, il a été montré que le betasatellite avait généralement un impact positif sur l'accumulation de l'ADN du virus assistant.

L'ARN satellite ST9 stimule l'accumulation de l'ARN et de la protéine de capsid de la souche ST9 du BYWV mais contrairement à ce qui avait été suggéré, ces augmentations ne traduisent pas une abolition de la restriction du virus au phloème (Sanger et al., 1994).

Des effets bénéfiques similaires ont été décrits dans le cas du virus satellite SPMV. Lors d'une co-infection du PMV avec le virus satellite SPMV sur mil, les accumulations du PMV et de sa protéine de mouvement P8 sont augmentées entraînant un effet positif sur le mouvement par rapport à une infection de PMV en absence de satellite. Les auteurs décrivent ce phénomène comme une synergie dans laquelle le SPMV joue un rôle de « catalyseur » sur l'accumulation du PMV. Compte tenu de cette synergie, la relation PMV/SPMV peut être décrite comme une relation mutualiste (Omarov et al., 2005; Scholthof, 1999).

Contrairement aux satellites manifestant des propriétés en cohérence avec une interaction mutualiste, les propriétés de l'ARNsat C, le satellite qui amplifie les symptômes du TCV (carmovirus), sont plus difficilement interprétables car elles paraissent contradictoires en

termes de bénéfice pour le virus assistant. D'un côté, l'ARNsat C induit une diminution de l'accumulation du TCV en interférant avec la stabilité des virions, mais ce phénomène a pour effet indirect de favoriser le mouvement à longue distance. Les interactions complexes du TCV avec l'ARN satC révèle un trade-off entre l'accumulation du TCV et son mouvement. Le maintien du TCV avec son virus assistant est probablement le résultat d'une optimisation de ce trade off sous l'effet de la sélection.

2.2.2.Effets négatifs

Alors que les ARNs satellites du CMV comptent parmi les plus répandus des satellites de virus de plantes, ils ne semblent pas avoir d'effet bénéfique sur leur virus assistant. En effet la présence de ces ARNs satellites diminue généralement l'accumulation du CMV et ceci dans différentes espèces d'hôtes (Escriu et al., 2000b). Cette diminution est communément attribuée à un effet de compétition pour les ressources de réplication (Wu and Kaper, 1995). De plus, la présence des satellites du CMV entraîne une diminution de la transmission (Escriu et al., 2000b). Il est aussi intéressant de noter que les satellites ont un effet indirect sur le virus en modifiant le comportement alimentaire des pucerons selon le type de satellite, nécrogène ou non-nécrogène. Les pucerons se nourrissent moins facilement sur des plantes contenant des satellites nécrogènes que sur des plantes contenant des satellites non-nécrogènes. Par contre les satellites non-nécrogènes ne sont pas systématiquement co-transmis avec le virus assistant alors que les satellites nécrogènes le sont. Les estimations de ces paramètres de fitness ont été utilisées dans un modèle déterministe d'évolution de la virulence qui prédit que l'émergence de génotypes de CMV qui assistent des ARNs satellites nécrogènes pour la tomate apparaîtraient uniquement en infection mixte avec des ARNs satellites non nécrogènes et sous une forte pression de pucerons vecteurs (Escriu et al., 2003). Outre les fortes prévalences d'association de CMV avec des ARNs satellites enregistrées au début des années 90 dans la région de Valence en Espagne (plus de 50% des échantillons positifs pour la détection de CMV contenaient de l'ARN satellite (Alonso-Prados et al., 1998)), la fréquence d'ARN satellites dans des populations de CMV du champ est généralement basse (Alonso-Prados et al., 1998; Grieco et al., 1997; Kearney, 1990)

En résumé, compte tenu de l'effet négatif des ARNs satellites sur l'accumulation et la transmission du CMV et de sa fréquence relativement basse dans les populations naturelles de CMV, les ARNs satellites du CMV ont été considérés comme des hyperparasites. Cette hypothèse est cohérente avec la décorrélation qui a été observée en Espagne entre la structure et la dynamique des populations du CMV et de celles des ARNs satellites échantillonnées entre 1989 et 1996 dans plusieurs régions d'Espagne (Alonso-Prados et al., 1998).

Tout comme le CMV, le TBSV subit un impact négatif des ARNs satellites sur son accumulation et l'intensité de cet impact dépend du type de satellite. La réduction est

drastique avec l'ARN satellite B10 mais moins marquée pour l'ARN satellite B1. Il est intéressant de noter que cette réduction est corrélée avec l'effet des satellites sur les symptômes, B10 les atténuant et B1 ne les modifiant pas (Célix et al., 1999). Malgré cet effet négatif sur l'accumulation virale, de tels satellites ont pu être trouvés dans 4 échantillons de terrain infecté par le TBSV sur un total de 57 (Célix et al., 1997).

L'ARN satellite du BaMV, l'unique ARN satellite trouvé chez les potexvirus, a un effet négatif sur l'accumulation virale.

Les deux virus satellites qui ne sont pas associés à des virus de plantes et que nous avons décrits ci-dessus sont eux aussi considérés comme des parasites. En effet, l'AAV a un effet délétère sur l'accumulation de son virus assistant car celle-ci est diminuée de 90% (Parks et al., 1968). Le virus satellite Sputnik présente un impact négatif sur l'APMV, son virus assistant, qui se traduit par des formes abortives de l'APMV et une diminution d'environ 70% de la production de particules infectieuses. Des observations en microscopie électronique révèlent un assemblage anormal de la capsid qui rappelle l'effet de l'ARNsat C du TCV qui interfère avec la stabilité des particules virales du virus assistant. Les découvreurs du sputnik ont jugé nécessaire de créer une nouvelle catégorie de virus pour classer cette entité, en proposant de l'appeler virophage par analogie avec les bactériophages. Leur principal argument pour créer cette nouvelle catégorie, c'est qu'ils considèrent que c'est le premier satellite qui a un effet nuisible sur la production de virions normaux. Cette nouvelle terminologie a été remise en question par Mart Krupovic et Virginija Cvirkaite-Krupovic dans un commentaire publié dans *Nature Reviews in Microbiology* où ils s'emploient à montrer que sputnik ne présente pas suffisamment de caractéristiques originales pour ne pas le classer dans la catégorie déjà existante des virus satellites (Krupovic and Cvirkaite-Krupovi .c, 2011). Leurs argumentations reposent sur le fait que les virus satellites de virus d'animaux ou de plantes présentent des comportements similaires. Ainsi, un excès de STNV pendant la co-infection avec le TNV se traduit par une très faible accumulation du TNV, en dessous du seuil de détection, et cette réduction est liée à une réduction de la synthèse de la CP (Jones and Reichmann, 1973). De même l'AAV peut réduire la production d'adénovirus de 90% (Parks et al., 1968).

2.2.3.Effet neutre

Pour certains satellites, aucune des propriétés décrites ne semble être à même d'apporter un effet bénéfique sur le virus assistant. Ceci ne doit évidemment pas être interprété comme une absence d'effets bénéfiques ou négatifs en particulier pour des satellites qui ont été très peu étudiés tels que ceux des népovirus.

Une des rares études sur l'impact des ARNs satellites de grande taille des népovirus sur l'accumulation du virus assistant révèle, dans le cas de la souche lilas de l'ArMV, que la quantité d'antigènes viraux dosée par ELISA n'était pas significativement différente en

présence ou absence de satellite sur quatre espèces d'hôtes, *Nicotiana megalosiphon*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* or *Pisum sativum* (Liu et al., 1991).

La présence du satellite virus STMV ne semble pas non plus avoir un impact sur l'accumulation génomique de son virus assistant, le TMGMV (Dodds, 1998).

Comme les satellites paraRep des Nanovirus et les alphasatellites des begomovirus n'induisent que très rarement une modulation des symptômes de leur virus assistant, ils ont été moins étudiés que les betasatellites de begomovirus. Par comparaison avec les betasatellites qui modulent les symptômes du virus assistant et ont un effet avéré sur lui, il est généralement admis que les alphasatellites n'ont pas d'effet marqué sur leur virus assistant. Deux études qui ont approfondi cette question suggèrent cependant que des alphasatellites pourraient avoir un effet négatif sur l'accumulation de leur virus assistant. C'est le cas de l'alphasatellite du AYVV (Saunders et al., 2002b) et d'un okra leaf curl alphasatellite testé avec le OYCrV, CLCuGV, ToLCMLV et ToYLCrV (Kon et al., 2009). Cet effet négatif sur le virus assistant pourrait à son tour induire un effet négatif sur le betasatellite et l'expression de la protéine betaC1 (responsable des symptômes) qui finalement se traduirait par une atténuation des symptômes viraux (Nawaz-ul-Rehman et al., 2010). Pourtant, malgré le fait que ces satellites pourraient avoir un effet négatif (Saunders et al., 2000; Timchenko, 2006), ils sont détectés relativement fréquemment en conditions naturelles (Grigoras et al., 2014; Tiendrébéogo et al., 2010) et le plus souvent en association avec des betasatellites.

Ce tour d'horizon de l'effet des satellites sur leur virus assistant révèle que dans nombre de cas les raisons du maintien du satellite en association avec le virus assistant n'ont pas été clairement établies. Outre les associations où les satellites sont incontestablement nécessaires au virus assistant (voir paragraphe « 2.2.1. effet bénéfique »), les raisons du maintien des satellites qui n'ont pas d'effet détectable sur le virus assistant et à fortiori ceux qui ont un effet négatif, ne sont pour le moment pas bien connues. Nous proposons d'aborder cette question en examinant dans le paragraphe suivant des paramètres supposés importants dans le maintien d'une association virus satellite tels que la transréplication, la co-infection cellulaire, le mouvement dans la plante et le passage entre hôtes.

3. Facteurs impliqués dans le maintien d'un satellite par un virus

Pour qu'un satellite se maintienne en association avec son virus assistant, on peut supposer qu'il présente au minimum les caractéristiques suivantes :

Il faut que le satellite se réplique. S'il n'est pas autonome pour sa réplication, il doit être reconnu par le mécanisme de réplication du virus assistant.

Afin de profiter de la machinerie de réplication du virus assistant et d'autres fonctions essentielles à sa propagation, il est généralement admis que le satellite doit obligatoirement se retrouver en situation de co-infection cellulaire avec le virus assistant.

Tout comme le virus assistant, le satellite doit pouvoir coloniser son hôte. Pour cela il doit pouvoir aller d'une cellule à l'autre et aussi, bouger en systémie. Il doit donc bénéficier des fonctions virales permettant le mouvement à courte et longue distance du virus

Pour être transmis vers un nouvel hôte, les satellites doivent pouvoir s'accumuler suffisamment dans leur hôte afin d'être transmis par l'intermédiaire d'un vecteur. Cette étape est souvent conditionnée par l'encapsulation du satellite.

Nous allons examiner ce qui est connu chez les satellites par rapport à ces caractéristiques

3.1. La réplication du satellite

Certains ADNs satellites de plantes et le virus satellite AAV d'animaux sont autonomes pour leur réplication car ils codent pour des protéines Rep (replication initiator protein) capable de mobiliser une polymérase de l'hôte.

Dans le cas des ADNs satellites de virus de plante, à savoir les composants para-rep des Nanovirus (Timchenko, 2006) et les alphasatellites des begomovirus (Bridson et al., 2004), une seule Rep est nécessaire pour la réplication en cercle roulant et c'est la seule qui est codée par ces satellites. La Rep des satellites a une séquence homologue à la Rep multifonctionnelle de leur virus assistant. On suppose qu'elles sont donc capable des mêmes fonctions que les Rep des virus et notamment des activités hélicase, ATPase, coupure et ligation d'ADN nécessaire à la réplication en cercle roulant de ces génomes circulaires (Desbiez et al., 1995; Laufs et al., 1995a).

L'AAV code pour quatre protéines Rep qui permettent de coordonner la réplication de son génome linéaire de 4,7 kb par des activités polymérases de leur hôte. Le génome comporte des extrémités formant des structures palindromiques qui selon le modèle de réplication de l'AAV permet l'amorçage de la réplication. Les Reps sont multifonctionnelles, elles interagissent avec des motifs spécifiques du génome —Rep binding element (RBE) et un site de clivage (trs) — et assurent des activités endonucléases site spécifique, hélicase et ATPase.

L'autonomie de réplication a également été décrite chez les ARNs satellites linéaires de grande taille et chez des petits ARNs circulaires. C'est notamment le cas du ARN satellite ST9

associés à la souche ST9 polérovirus BWYV qui semblent coder pour une RdRp (ARN polymérase ARN dépendante) semblable à celle des carmovirus (Passmore et al., 1993).

Les séquences peptidiques déduites des ORFs de l'ARN satellite de la souche ST9 du BWYV présentent des homologies avec des séquences de RdRp de carmovirus (famille *Tombusviridae*). Des analyses de traduction *in vitro* de l'ARN satellite ont permis de générer des protéines de différentes tailles, la plus grande ayant une taille d'environ 84 kDa (Chin et al., 1993).

L'hypothèse de l'autonomie de ce satellite pour la réplication a été validée en montrant que l'ARN satellite ST9 pouvait se répliquer sans virus assistant dans des protoplastes électroporés de *Nicotiana tabacum* (cv. Xanthi nc) et aussi sur des plante de *Capsella bursa-pastoris* mais uniquement dans la feuille inoculée. Ces résultats montrent qu'en dépit de son autonomie pour la réplication, ST9 reste tributaire de son virus assistant pour son mouvement systémique dans la plante (Passmore et al., 1993).

Les petits ARNs circulaires trouvés en association notamment avec des népovirus, des sobémovirus ou des polérovirus ont souvent été comparés à des viroïdes, des entités qui ne dépendent pas d'un virus assistant pour leur réplication (Hu et al., 2009).

En effet, comme les viroïdes, ils sont de petites tailles, ils ne présentent pas d'activité de messenger, ils présentent des structures secondaires très développées avec des motifs conservés. Dans le cas du l'ARN satellite du TRSV, il a été montré que la forme la plus abondante de l'ARN satellite encapsidé est une forme monomérique linéaire pouvant être des deux polarités, la plus abondante ayant été désignée comme (+) par convention. Les tissus infectés contiennent en plus des oligomères et des cercles des deux polarités. Ces différentes formes de l'ARN satellite du TRSV rappellent le mode de réplication en « rolling circle » (réplication sur cercle roulant) des viroïdes. Il a été montré qu'un monomère de l'ARNsat exprimé de façon stable dans un tabac transgénique (Robaglia et al., 1993) ou à l'aide d'un vecteur géminivirus (African cassava mosaic virus, ACMV) dans des protoplastes de tabac (Chay et al., 1997) pouvait se circulariser en absence du TRSV. Outre cette étape importante de circularisation qui est théoriquement la première étape d'une transcription en cercle roulant, il a également été montré que des multimères de l'ARN satellites sont capables d'autoclivage *in vitro* grâce à une structure secondaire en forme de « hammerhead » également trouvée chez les viroïdes qui s'en servent dans leur cycle de réplication.

Les petits ARNs satellites circulaires des polérovirus présentent également les formes caractéristiques d'une transcription en cercle roulant, avec des formes circulaires et multimériques capables d'autoclivage par des structures de types ribozymes en forme de « hammerhead » (Rasochova and Miller, 1996).

Cette proximité des ARNs satellite avec les viroïdes leur a valu le nom de « virusoïdes ». En dépit de leur autonomie pour certaines étapes clés du modèle de transcription en cercle roulant, les ARNs satellites restent tributaires de leur virus assistant pour leur réplication.

Par contre cette autonomie relative pour certaines étapes de leur cycle de réplication semble cohérente avec leur capacité à se répliquer dans des hôtes très différents et avec des virus assistants hétérologues. Il a été montré que l'ARN satellite du LTSV pouvait être répliqué par des *sobemovirus* qui n'avaient pas été trouvés avec des satellites en conditions naturelles, et non seulement le SBMV, le SoMV, le turnip rosette virus (TRoV) qui sont des sobémovirus de dicotylédones comme son assistant naturel, le LTSV, mais aussi le CoMV, un sobémovirus infectant des plantes monocotylédones, et notamment le blé et l'espèce fourragère *Dactylis glomerata*. Cette flexibilité de l'association n'est cependant pas complètement indépendante de l'espèce hôte, car il a été montré que l'assistance de l'ARN satellite du LTSV par le TRoV n'a été possible sur *Brassica rapa*, *Raphanus raphanistrum* et *Sinapsis arvensis* mais pas sur *Thlaspi arvense* et *Nicotiana bigelovii* (Sehgal et al., 1993).

La flexibilité de l'association « satellites virusoïde/virus assistant » a également été montrée dans le cas des polérovirus (famille *Lutéoviridae*). Ainsi, l'ARN satellite RPV détecté en présence d'un polérovirus de monocotylédone, le CYDBV-RPV, peut être transrépliqué par BWYV, un polérovirus de dicotylédone. Par contre l'ARN satellite ST9 du BWYV qui est autonome pour sa réplication n'a pas réussi à transrépliquer l'ARN satellite RPV en protoplaste de tabac (Rasochová et al., 1997). Cet échec viendrait du fait que le l'ARN satellite ST9 code pour une RdRp de virus du genre lutéovirus (famille *Luteoviridae*) qui est différente de celle du genre polérovirus et donc de celle CYDV et du BWYV. Cependant, en dépit de l'absence de transréplication, l'accumulation du satellite RPV est augmentée en présence de ST9 car ce satellite augmente considérablement l'accumulation du BWYV, leur virus assistant commun.

Les contraintes par les espèces hôtes sur la réplication des virus assistants et des ARNs satellites sont apparemment différentes. En effet, alors que le LTSV et le BWYV ne peuvent infecter que des dicotylédones, leurs ARNs satellites peuvent infecter aussi des monocotylédones.

Les satellites qui ne sont pas autonomes pour leur réplication, doivent présenter des motifs génomiques leur permettant d'être reconnus par le virus assistant.

Dans le cas des ARNs satellites du TBSV (genre *tombusvirus*, famille *Tombusviridae*), il a été proposé que la seule région des satellites B1 (822nt) et B10 (613nt) qui est homologue au virus assistant (50nts) est un site important pour leur reconnaissance par la réplicase du TB (Russo et al., 1994). Plus récemment, à l'aide d'un ARN satellite de taille comparable (619 nts) trouvé en association avec le Cymbidium ringspot virus (CymRSV), il a été montré que ce ne sont pas uniquement les homologies de séquence qui peuvent jouer un rôle dans l'accumulation efficace des ARNs satellites mais également des repliements comparables de

la structure secondaire des ARNs satellite et du virus assistant (Chernysheva and White, 2005). Il a été proposé qu'un tel système de reconnaissance limitant les homologies de séquences, puisse être une stratégie pour réduire l'induction du gene silencing dommageable à la fois pour le virus et pour le satellite.

Le modèle *tombusvirus* a également permis de montrer que la spécificité d'assistance à des ARNs satellites pouvait être liée à une différence d'efficacité de réplication. Ainsi, il a été montré qu'une mutation dans la protéine p36 du carnation Italian ringspot virus (CIRV), une protéine qui joue un rôle dans la réplication sans pourtant codée pour la RdRp (p95), est responsable d'une différence d'efficacité de réplication des ARNs satellites B1 et B10 du TBSV (Célix et al., 1999).

Il a également été montré que ces deux protéines de réplication à elles seules n'étaient pas capables de répliquer les ARNs satellites alors qu'elles étaient suffisantes pour répliquer de l'ARN défectifs de *tombusvirus*. Cette observation montre que la stratégie de réplication des ARNs satellites est différente de celle de l'ARN des virus assistants (Rubino, 2004).

Dans le cas de l'ARN satellite du BaMV c'est également une structure secondaire qui semble être impliquée dans la reconnaissance du satellite par son virus assistant pour la réplication. Une grande structure en tige-boucle a été identifiée dans les 117 nt de la partie 5' terminale non traduite du génome du BaMV. Par mutagenèse, il a été montré que cette structure secondaire était importante pour l'efficacité de l'accumulation du BaMV dans *N. benthamiana*. Conformément aux à la définition des satellites, l'homologie de séquence entre le virus assistant BaMV et ses différents ARNs satellites se limite à une région « leader » riche en adénine à l'extrémité 5' terminale. Par contre au niveau de la structure secondaire, on constate que la tige boucle du BaMV impliquée dans son accumulation est présente également sur les ARNs satellites, ce qui suggère que cette région participe à la reconnaissance des satellites pour leur réplication (Chen et al., 2010).

Dans le cas particulier de l'ARN satellite satC du TCV un autre virus de la famille *Tombusviridae* mais du genre *Carmovirus*, l'extrémité 3' terminal de son brin négatif "3'-OHCCCUAU," présente une homologie avec une région conservée de l'extrémité 3' terminal du brin négatif du génome de tous les carmovirus. Des mutations ponctuelles dans cette région réduisent drastiquement l'accumulation du brin (+) de l'ARN satellite en protoplaste en passant sous le seuil de détection (Guan et al., 2000).

Comme dans le cas de l'ARN satellite du CymRSV où des structures secondaires sont importantes pour une accumulation efficace, une structure secondaire est également importante, voir indispensable, à la réplication des betasatellites. Cette structure secondaire en tige d'environ 10 nts porte une boucle portant un motif de neuf nucléotides (nonanucleotide) TAATATTAC (Bridson et al., 2003) qui est identique à celui que l'on trouve au sommet d'une structure secondaire du même type chez les begomovirus et qui est absolument nécessaire à l'initiation de la réplication par le complexe recruté par la Rep des

begomovirus. Cette séquence extrêmement conservée chez les géminivirus a été identifiée comme une origine de réplication (Laufs et al., 1995b). Etant donné qu'elle est indispensable à la réplication des betasatellites (Stanley, 1995), il est généralement supposé que le mécanisme de réplication est le même que celui des begomovirus. Cependant, il reste des zones d'ombre sur le mécanisme de reconnaissance des betasatellites par la protéine Rep des begomovirus. La protéine Rep présente avec le génome dont elle est issue, une spécificité étroite, qui ne lui permet d'initier que les génomes de virus appartenant à son espèce. Cette spécificité est associée à des itérons de 4 ou 5 nts situés dans la région intergénique à proximité de l'origine de réplication (Fontes et al., 1994a). Les betasatellites ont la caractéristique intéressante de défier cette spécificité car ils ne contiennent pas toujours les itérons conservés de leurs begomovirus assistants. D'autres motifs probablement plus diffus déterminent la reconnaissance des génomes de betasatellites pour leur réplication (Briddon et al., 2001; Saunders et al., 2000). Des séquences inversées répétées formant une tige boucle ont été identifiées de façon conservée chez les betasatellites associés aux begomovirus du Bassin du Nil et d'Asie (Idris et al., 2005) et des séquences similaires ont été identifiées comme importantes pour la transréplication de l'Ageratum yellow vein betasatellite (AYVB) par mutagenèse (Saunders et al., 2008).

Enfin il est important de noter que les ARNs satellites du CMV peuvent être répliqués dans le noyau indépendamment du virus assistant. Cette découverte est cohérente avec des observations précédentes qui avaient révélées que les ARNs satellites du CMV pouvaient se maintenir pendant 25 jours en absence de virus assistant (Choi et al., 2012).

3.2. La co-infection cellulaire

Comme les virus sont des organismes intracellulaires, il est généralement admis que les satellites ne peuvent tirer avantage de leur virus assistant qu'en situation de co-infection cellulaire avec le virus assistant. Il n'existe aucune étude qui montre la localisation cellulaire des virus et des satellites. La capacité du satellite à co-infecter une cellule avec son virus assistant pourrait dépendre de la multiplicité d'infection cellulaire (MOI) du virus, un paramètre encore très mal connu pour la plupart des virus (Gutiérrez et al., 2010).

La MOI d'un virus est un paramètre étant définie comme le nombre de génomes viraux qui infecte efficacement chaque cellule durant la colonisation d'un hôte. Comme les ARNs ou ADN satellites sont encapsidés dans la capsid du virus, il est possible que les mécanismes qui sous-tendent la MOI puissent concerner les satellites, surtout ceux qui agissent à une étape précoce, avant décapsidation, où virus et satellite ne sont théoriquement pas discernables. Plusieurs potyvirus (famille *Potyviridae*), le potato virus X (PVX) (genre *Potexvirus*, famille *Alphaflexiviridae*), l'alfalfa mosaic virus (genre *Alfamovirus*, family

Tableau 1: Famille des virus à satellite

Famille	Genre	Groupe	Nombre d'espèce de satellite	Hôte	Type de satellite	Nature du génome
<i>Alphaflexiviridae</i>		Large linear ss RNA	1	Virus de plante	acide nucléique satellite	ssRNA
<i>Bromoviridae</i>		Small linear ss RNA	2	Virus de plante	acide nucléique satellite	ssRNA
<i>Geminiviridae</i>	<i>Begomovirus</i>	alphasatellites	24	Virus de plante	acide nucléique satellite	ssDNA
<i>Geminiviridae</i>	<i>Begomovirus</i>	betasatellites	60	Virus de plante	acide nucléique satellite	ssDNA
<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Orthohepadnavirus</i>	Adeno associated virus	8	Virus humain	acide nucléique satellite	ssRNA
<i>Luteoviridae</i>		Small circular ss RNA	1	Virus de plante	acide nucléique satellite	ssRNA
<i>Luteoviridae</i>	<i>Polerovirus</i>		3	Virus de plante	acide nucléique satellite	ssRNA
<i>Mimiviridae</i>	<i>Mimivirus</i>	Sputnik	1	Virus d'amibe	Satellite viruses	
<i>Nanoviridae</i>	<i>babu et nano-virus</i>	alphasatellites	15	Virus de plante	acide nucléique satellite	ssDNA
<i>Nodaviridae</i>	<i>nodavirus</i>	Macrobrachium rosenbergii nodavirus XSV	1	virus de crevette	Satellite viruses	
<i>not yet classified</i>		Chronic bee-paralysis satellite virus	1	Virus d'abeille	Satellite viruses	
<i>Partitiviridae</i>			10	Mycovirus	acide nucléique satellite	dsRNA
<i>Parvoviridae</i>	<i>Dependovirus</i>	Adeno-associated virus	17	virus animaux, reptile	Satellite viruses	
<i>Reoviridae</i>			1	Mycovirus	acide nucléique satellite	dsRNA
<i>Secoviridae</i>		Large linear ss RNA	9	Virus de plante	acide nucléique satellite	ssRNA
<i>Secoviridae</i>		Small circular ss RNA	3	Virus de plante	acide nucléique satellite	ssRNA
<i>Tombusviridae</i>		Maize white line mosaic satellite virus	3	Virus de plante	Satellite viruses	
<i>Tombusviridae</i>		Small linear ss RNA	9	Virus de plante	acide nucléique satellite	ssRNA
<i>Totiviridae</i>	<i>Totivirus</i>		8	Mycovirus	acide nucléique satellite	dsRNA
Unassigned	<i>Benyvirus</i>	Large linear ss RNA	1	Virus de plante	acide nucléique satellite	ssRNA
Unassigned	<i>Umbravirus</i>	Small linear ss RNA	4	Virus de plante	acide nucléique satellite	ssRNA
Unassigned	<i>Sobemovirus</i>	Small circular ss RNA	5	Virus de plante	acide nucléique satellite	ssRNA
<i>Virgaviridae</i>		Tobacco mosaic satellite virus	1	Virus de plante	Satellite viruses	

Bromoviridae) et le Citrus tristeza virus (genre *Closterovirus*, famille *Closteroviridae*) ont manifesté des profils d'infection qui sont cohérents avec le phénomène d'exclusion cellulaire (Bergua et al., 2014; Dietrich, 2003).

Pour ces virus, où une infection primaire empêche une infection secondaire, la MOI serait de 1. Si comme indiqué ci-dessus, le phénomène d'exclusion peut potentiellement concerner le satellite, on imagine que ces virus ne sont pas favorables à l'assistance à un satellite. Il est intéressant de noter qu'aucun des genres concernés ne contient de virus associé à des satellites (Tableau 1). Il est possible que la MOI soit un paramètre moins important pour les virus satellite car le phénomène d'exclusion ne porte généralement que sur le même virus ou un virus proche, ce qui est contraire à la définition des satellites qui stipule une origine distincte par rapport au virus.

3.3. Le mouvement de cellule à cellule et à longue distance des satellites

Comme la « porte d'entrée » d'un virus dans son hôte est généralement différente de sa « porte de sortie », le satellite doit pouvoir parcourir efficacement ce trajet entre les « deux portes » pour avoir une chance de se propager d'un hôte à l'autre. Quand l'hôte est une plante, la porte d'entrée est la feuille inoculée, et la porte de sortie est une autre feuille, souvent plus jeune et qui aura été formée après l'entrée du virus dans la plante. Le déplacement du virus de cellule à cellule ou à longue distance se fait le plus souvent avec la protéine de capsid, sous forme de nucléocapsid ou sous forme de virions, et dépend d'une ou plusieurs protéines non structurales, dite protéine de mouvement. On admet généralement, mais sans preuve expérimentale, que les acides nucléiques (AN) satellites (ADN ou ARN), qui de fait et par définition ne codent pas pour une protéine de capsid, bénéficieraient tout naturellement des mécanismes de mouvement de son virus assistant car ils utilisent la même capsid que le virus assistant. On peut prévoir que dans le cas d'une circulation sous forme de virions, une coque (capsid) contenant un AN satellite et une coque contenant un AN viral seront difficilement distinguables par les protéines de mouvement.

Dans le cas des virus satellite qui par définition code pour leur propre capsid, il n'existe pas forcément de dépendance du virus assistant pour le mouvement. C'est le cas du satellite virus SPMV dont la protéine de capsid de 17kD a été identifiée en association avec la membrane plasmique à proximité des plasmodesmes, une localisation qui suggère une fonction dans le mouvement de cellule à cellule (Qi et al., 2008).

Outre les potentielles fonctions de mouvement de la CP du SPMV, c'est également ce même virus satellite qui a un effet positif sur le mouvement de son virus assistant dont l'expression des protéines CP et de mouvement (P8) est augmentée par rapport à une infection en absence de virus satellite (Scholthof, 1999).

Outre le SPMV, l'ARNsat du BaMV est un autre exemple de satellite plante qui participe à son propre mouvement. La protéine P20 codé par l'ARNsat du BaMV n'est pas une protéine de

capside mais présente des propriétés biologiques de protéine de mouvement de virus, telles que des activités de liaison à l'ARN, une interaction sur elle-même, une localisation cellulaire et un mouvement efficace de cellule à cellule sans compter son implication dans le mouvement du satellite en plante (Vijayapalani et al., 2012, 2006).

Le petit ARN satellite satC (356 nt) du TCV aurait également un effet positif sur le mouvement de son virus assistant. Son impact sur l'aggravation des symptômes du TCV serait lié à un effet positif de l'ARNsat C (associé au TCV) sur le mouvement de cellule à cellule et le mouvement à longue distance du virus. Cet effet stimulant sur le mouvement serait lui-même lié à un impact négatif sur la stabilité des particules virales. Cette interférence avec la stabilité des particules virales entraînerait une augmentation de la concentration de protéines CP libres qui contrairement à sa forme cristallisée (virions) est un suppresseur très efficace du PTGS (Post transcriptional gene silencing). On ne connaît pas le mécanisme par lequel l'ARNsat C interfère avec l'accumulation de virions stables.

3.4. La transmission

La transmission est une étape importante dans le cycle du virus, car elle permet au virus de quitter son hôte, une étape particulièrement cruciale quand la vie de l'hôte a une durée de vie relativement limitée, plante annuelle versus plante pérenne. Tout comme le mouvement, la transmission des virus se fait le plus souvent sous la forme de virions. Les AN satellites qui ne codent pas pour leur propre capsid sont hébergés dans la capsid du virus assistant ce qui leur confère théoriquement la capacité à être transmis par son vecteur.

Chez les géminivirus, l'encapsidation impose une contrainte de taille sur les ADNs à encapsider. En effet, le génome doit avoir une taille d'environ 2,6- 2,8 kb pour les coques en double icosaèdre et de la moitié cette taille pour les icosaèdres simples. Il a été proposé que la région riche en adénine présente chez tous les alphasatellites est une trace de l'adaptation de taille à laquelle ces satellites ont été contraint du fait qu'il dérive de composants satellites ou génomiques de Nanovirus qui ont tous une taille d'environ 1 kb. (Bridson et al., 2004). Cette région est également présente chez les betasatellites dont l'origine reste pour le moment inconnue.

Une expérience originale avec deux ARNs satellites de polérovirus, montre qu'un satellite peut avoir un effet bénéfique sur la transmission par vecteur de l'autre satellite. Ainsi, ce n'est qu'en présence du satellite ST9 du BWYV que le satellite RPV du CYDV a pu être transmis par le puceron *Myzus persicae* de protoplastes infectés à *C. bursa-pastoris*. Avec des protoplastes infectés uniquement avec BWYV et RPV la concentration de RPV n'était pas suffisante pour permettre sa transmission par puceron.

Contrairement aux AN satellites, l'assistance des virus satellites pour la transmission paraît moins évidente. En effet comme les virus satellites n'ont pas la même capsid, on voit difficilement comment un même vecteur pourrait transmettre virus assistant et virus satellite.

Pour beaucoup de virus, la spécificité de la transmission est déterminée par la protéine de capside. On remarque cependant que parmi les quatre virus satellites de plante présentés ci-dessus, il n'y en a qu'un seul pour lequel le vecteur du virus assistant est connu. Il s'agit du TNV qui serait transmis par les zoospores *Oplidium brassicae*, un champignon infectant les racines. La transmission par champignon n'est peut-être pas aussi spécifique que celle par des insectes ou nématodes pour lesquels des spécificités relativement strictes ont été décrites. Pour ce qui est des trois autres, il est possible que la transmission se fasse par voie mécanique ce qui limiterait la contrainte de la spécificité d'une transmission biotique.

L'objectif principal de cette thèse est d'estimer la possibilité du maintien d'une association entre le TYLCV et des satellites dont certains aggravent dangereusement sa virulence. Plusieurs paramètres nous ont paru importants à examiner pour traiter la question du maintien. Après avoir examiné ce qui en était connu pour les associations naturelles « virus-satellites », je vais présenter le modèle TYLCV et les satellites que nous proposons de tester dans cette thèse. Outre le fait que ce modèle est important sur le plan agronomique, je montrerai également son intérêt sur un plan plus fondamental. Cet intérêt supplémentaire vient du fait que dans le cas des begomovirus, un même virus peut assister des alphasatellites et des betasatellites, deux satellites qui interagissent de façon très différente avec leur virus assistant.

4. Un modèle d'étude original : le TYLCV et les satellites de begomovirus

4.1. Le TYLCV

Le TYLCV est un virus du genre *Begomovirus* (Famille des *Geminiviridae*). Les begomovirus sont caractérisés par un génome qui est soit monopartite (composé d'une seule molécule d'ADN, DNA-A) ou bipartite (composé de deux molécules d'ADN, DNA-A et DNA-B). Ils sont transmis par la mouche blanche (ou aleurode) *Bemisia tabaci*, et ils infectent des plantes dicotylédones.

4.1.1. Importance agronomique et distribution géographique

Le TYLCV est un begomovirus responsable de la plus importante maladie virale sur tomate dans de nombreuses régions tropicales et subtropicales, et les pertes de rendement quantitatives et qualitatives peuvent atteindre jusqu'à 100% (Abhary et al., 2007; Butterbach et al., 2014; Picó et al., 1996). C'est un virus invasif d'origine méditerranéenne présent au Moyen-Orient, en Afrique du Nord et centrale, en Asie du Sud-Est, en Amérique et en Europe (Lefevre et al., 2010). La classification des begomovirus répertorie sept souches différentes de TYLCV (Brown et al., 2015) parmi lesquelles la souche Mild (Mld) et la souche type Israël (IL) qui sont les plus invasives. Elles présentent 91% d'homologie de séquence et diffèrent principalement dans la moitié 5' du gène de la Rep et la région 5' de la région intergénique

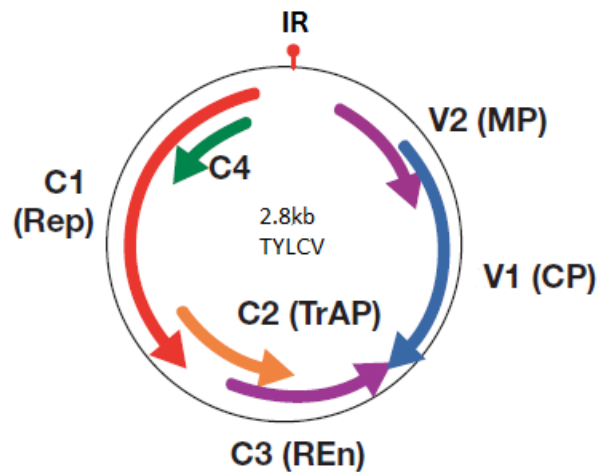


Figure 2: Organisation génomique du TYLCV. Rep : Replication initiator protein, MP : Protéine de Mouvement, CP : Protéine de Capside, REn : Replication Enhancer, TrAP : Transcription Activator Protein, IR : Région Intergénique (Czosnek, 2007).

Tableau 2: Les fonctions des gènes du TYLCV (Glick et al., 2009; Wartig et al., 1997).

Gène	Fonction
V1 (CP)	Protéine de capside, joue un rôle dans la transmission, et le mouvement
V2 (MP)	Joue un rôle dans le mouvement
C1 (Rep)	Nécessaire pour la réplication, interaction spécifique avec des séquences d'ADN de la région intergénique
C2 (TrAP)	Trans-activateur de l'expression du gène de la CP.
C3 (REn)	Augmente l'efficacité de réplication
C4	Agit au niveau de l'expression des symptômes et du mouvement

(IR). Le TYLCV-II est un recombinant du TYLCV-Mld qui aurait hérité de cette région par recombinaison avec un virus proche du tomato leaf curl Bangalore virus (ToLCBaV), anciennement tomato leaf curl Karnataka virus (Lefevre et al., 2010; Navas-Castillo et al., 2000).

4.1.2. Organisation génomique du TYLCV

Le génome à ADN simple brin du TYLCV est composé de six cadres ouverts de lecture (ORF) partiellement chevauchants, orientés de façon bidirectionnelle (Figure 2), dont les fonctions sont décrites dans le Tableau 2: deux ORF sont codés par le brin viral (V1 et V2), et quatre sont codés sur le brin complémentaire (C1-C4). La région intergénique d'environ 300 nt contient les séquences promotrices des gènes, des séquences appelées itérons qui interviennent dans la reconnaissance du génome par la protéine Rep et une structure en tige-boucle parfaitement conservée chez tous les géminivirus qui porte l'origine de réplication dans le nonanucléotide « TAATATT¹AC ».

4.1.3. La réplication du TYLCV

Les géminivirus se répliquent dans les noyaux des cellules infectées, essentiellement par un mécanisme de *rolling circle replication* (RCR) (Figure 3). Le mécanisme de réplication a été identifié à partir d'études conduites sur différentes espèces du genre begomovirus. Tout d'abord, l'ADN viral est décapsidé et transformé en ADN double brin par synthèse d'un brin complémentaire. Chez les begomovirus, notamment pour l'African cassava mosaic virus il a été montré qu'une amorce ARN complémentaire d'une séquence localisée dans la IR était synthétisée après l'infection (Saunders et al., 1992) ; cependant, ni la taille de l'amorce, ni le site précis de l'initiation n'ont été caractérisés. De plus, aucune des protéines de l'hôte impliquées dans la synthèse du brin viral complémentaire n'ont été identifiées. Il a été montré pour le ToLCNDV que la forme double brin, est reconnue par la protéine Rep au niveau de courtes séquences répétées, ou itérons, qui joueraient un rôle majeur dans la spécificité de la réplication (Chatterji et al., 2000). La réplication est initiée par une coupure effectuée par la Rep au niveau d'une structure hautement conservée chez le *Tomato Golden Mosaic Virus* (TGMV). Cette structure est constituée d'un nonanucléotide porté par une tige boucle : TAATATT¹AC (Fontes et al., 1994b; Laufs et al., 1995b). Les ADN polymérases de l'hôte utilisent l'extrémité 3'OH comme amorce pour la synthèse d'un brin d'ADN viral, en utilisant le brin complémentaire non coupé comme matrice. Après un tour de réplication, l'ADN déplacé est coupé et ligué par la protéine Rep entre les nucléotides T et A dans la séquence conservée de la boucle (Heyraud-Nitschke et al., 1995). L'ADN néoformé est soit encapsidé dans une capside en forme de double icosaèdre, soit transformé en ADN double brin. Au cours de la RCR, de nombreux intermédiaires de réplication issus de la terminaison prématurée du mécanisme sont réparés par un mécanisme de RDR (*recombination dépendant réplication*) (Preiss and Jeske, 2003) qui utilise des fragments d'ADN homologues issus d'erreurs de réplication pour initier de nouveaux génomes.

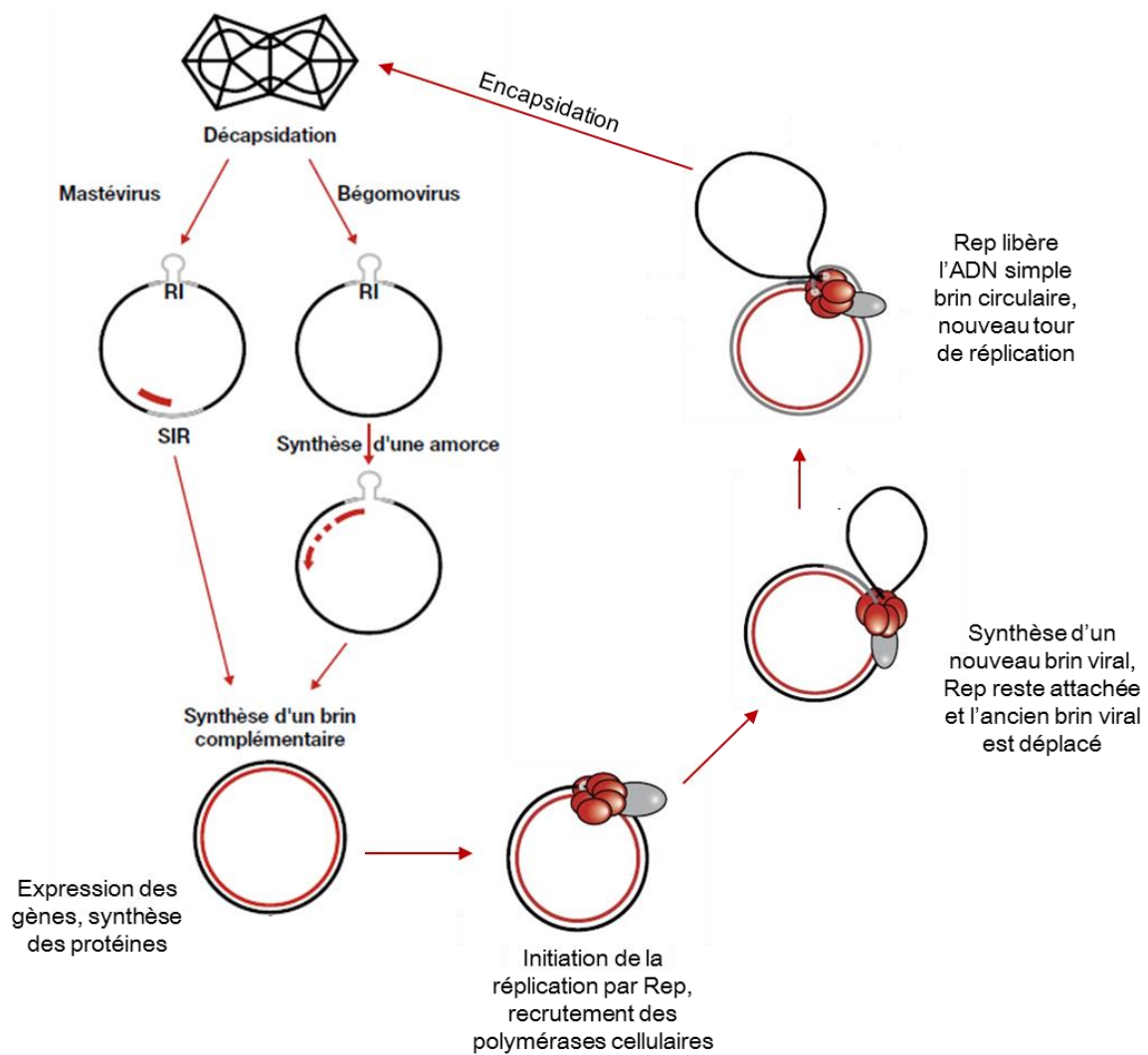


Figure 3: La réplication des virus à ADN simple brin selon le mécanisme du cercle roulant. D'après (Bernardi and Timchenko, 2008; Timchenko and Bernardi, 2007)

En plus d'assurer la réplication des génomes viraux, ces deux modes de réplication conduisent aussi à la génération de génomes défectifs (à qui il manque un ou plusieurs gènes (entiers) ou fragments de gènes). Ils possèdent tous la région tige boucle et les itérons nécessaires à leur réplication par le virus assistant, et en général ils ont perdu au moins une partie du gène de la Rep (Patil and Dasgupta, 2006). Il est donc supposé qu'ils sont répliqués selon les mêmes mécanismes que les génomes entiers (Patil and Dasgupta, 2006; Stanley et al., 1997). Dans la littérature, ces génomes défectifs ont le plus souvent une taille correspondant à la moitié et parfois au quart de celle du génome viral (1300 et 650 nt) (Patil and Dasgupta, 2006), et ils sont probablement encapsidés dans la même protéine de capsid sous forme de monoïcosaèdres (Frischmuth et al., 2001).

4.2. Les satellites des begomovirus

4.2.1. La découverte des satellites à ADN

Le premier satellite à ADN décrit a été le ToLCV-sat, un ADN circulaire simple brin de 682 nts, associé au Tomato leaf curl virus (ToLCV) en Australie (Dry et al., 1997). Il a été montré qu'il n'avait aucun effet sur la réplication virale ni sur les symptômes causés par ToLCV, bien qu'il soit dépendant du ToLCV pour sa réplication et son encapsidation. Il n'a pas d'ORF complet et a peu de similarité de séquence avec son virus assistant (ToLCV), à l'exception de la séquence TAATATTAC présente dans la tige boucle de tous les géminivirus. N'arrivant pas à reproduire au laboratoire les mêmes symptômes que ceux causés par l'Ageratum yellow vein virus (AYVV) au champ sur son hôte, Tan et al., (1995) avaient émis l'hypothèse qu'un autre facteur était nécessaire pour restaurer la pathogénicité chez l'hôte naturel. Un certain nombre de molécules ADN circulaires, contenant chacune l'origine de réplication de l'AYVV avec des séquences d'origine inconnue, ont été isolées à partir de plante d'*Ageratum conyzoides* infectées (Stanley et al., 1997). Des molécules similaires ont également été identifiées associées à un begomovirus responsable de la maladie du coton, le cotton leaf curl multan virus (CLCuMV) (Briddon et al., 2001; Liu et al., 1998). La recherche a conduit à l'isolement d'une petite molécule d'ADN simple brin circulaire, appelé ADN-1 (aujourd'hui appelé alphasatellite (Mansoor et al., 1999)). Cependant, la co-inoculation de l'AYVV et de l'alphasatellite ne permettait pas une infection symptomatique chez *A. conyzoides* (Saunders et al., 2000). Une sonde nucléotidique produite à partir d'une séquence inconnue trouvée dans un génome défectif d'AYVV a permis d'identifier, un nouveau composant ADN simple brin ayant environ la moitié de la taille des begomovirus assistant. Ce composant s'est avéré être responsable des symptômes causés par AYVV dans *A. conyzoides* (Saunders and Stanley, 1999). Il a été nommé ADN- β , puis par la suite betasatellite parce qu'il ressemblait fonctionnellement, au composant B de begomovirus bipartites.

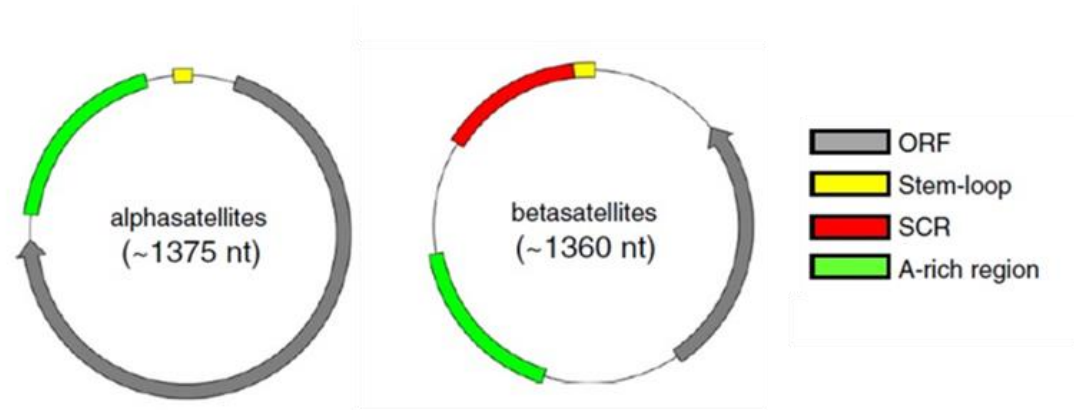


Figure 4: Les satellites des begomovirus (Fiallo-Olivé et al., 2012).

4.2.1. Les Betasatellites

Les betasatellites sont des molécules d'ADN simple brin d'environ 1.3 kb que l'on retrouve fréquemment associées aux begomovirus à génome monopartite en Afrique et en Asie. Ils ont une organisation hautement conservée constituée d'une région riche en adénine (A-rich), une région qui est conservée parmi tous les betasatellite appelée SCR (Satellite Conserved Region) et un seul cadre ouvert de lecture (ORF) sur le brin complémentaire qui code pour une protéine betaC1 (Figure 4). La SCR contient une structure en épingle à cheveux qui porte une origine de réplication (TAATATTAC) similaire à celle des géminivirus (Briddon et al., 2003). La protéine betaC1 a été montrée comme étant impliquée dans l'augmentation des symptômes causés par le virus assistant (Briddon and Markham, 2001; Nawaz-ul-Rehman et al., 2009; Patil and Fauquet, 2010; Saunders et al., 2000), l'augmentation de la gamme d'hôte (Saunders et al., 2002b) et ils ont un rôle dans la suppression du silencing (Cui et al., 2005a) et le mouvement du virus dans la plante (Saunders et al., 2000).

Les betasatellites dépendent du virus assistant pour la réplication, le mouvement dans les plantes, leur encapsidation et donc la transmission par vecteur. Le rôle de la protéine betaC1 sur le mouvement du virus reste flou. Il a été suggéré qu'elle avait un rôle direct sur le mouvement du virus en facilitant le mouvement de l'ADN viral dans les plantes (Saunders et al., 2000) ou un rôle indirect sur le mouvement du fait de sa fonction de supprimeur de silencing (Cui et al., 2005a). Yang et al., (2011) ont montré que la protéine betaC1 entière était nécessaire pour l'induction des symptômes du tomato leaf curl China betasatellite (ToLCCNB) dans *N. benthamiana* alors que seule la partie centrale de betaC1 (acides aminés 44 à 74) était responsable à la fois de l'activité de supprimeur de silencing et de la localisation nucléaire.

La réplication des begomovirus est un mécanisme plutôt spécifique reposant sur la reconnaissance de séquence itéron par la partie N terminal de la protéine Rep. Cependant, les betasatellites n'ont pas d'homologie de séquence avec leurs virus assistants, à l'exception de la séquence du nonanucléotide, et leur réplication qui est supposée se faire par le même mécanisme que celui des begomovirus (Alberter et al., 2005) ne semble pas spécifique (Mansoor, 2003; Saunders et al., 2002b). Ainsi, un seul virus, par exemple le ToLCNDV peut trans-répliquer plusieurs betasatellites (Jyothsna et al., 2013), et certains satellites peuvent être trans-répliqués par plusieurs virus assistant. Ainsi, le cotton leaf curl multan betasatellite (CLCuMB) peut être trans-répliqué par l'ageratum yellow vein virus (AYVV) et six begomovirus responsables de la maladie du coton (CLCuD). Par contre, l'*Ageratum Yellow Vein betasatellite* (AYVB) peut être assisté dans *N. benthamiana* par son virus assistant, l'AYVV, mais pas par le cotton leaf curl multan virus (CLCuMuV) (Saunders et al., 2008). Le TYLCV, qui n'est pas naturellement associé à des betasatellites en conditions naturelles peut trans-répliquer des betasatellites distincts du Japon, des Philippines et d'Afrique (Ito et al., 2009; Kon et al., 2009; Zhang et al., 2009) La compatibilité de transréplication des betasatellites

reste donc complexe. Ce sujet a déjà été abordé dans le paragraphe 3.1. Initialement, il a été suggéré que la SCR serait une région importante pour la trans-réplication du betasatellite par le virus assistant. Cependant, des analyses de délétion *in vitro* et l'étude des mutants d'origine naturelle suggèrent que, la région située entre la A-rich et la SCR serait impliquée dans la réplication (Saunders et al., 2008) et que la Rep virale ne se fixerait pas sur cette séquence mais qu'il y aurait une deuxième tige boucle (constituée par des séquences de type itérons) qui aurait une très forte affinité pour la Rep et dont la délétion bloquerait la réplication du ToLCsat (Li et al., 2007).

L'origine évolutive des betasatellites reste inconnue. Ils pourraient provenir de la capture par un begomovirus d'un composant étranger. L'encapsidation des molécules virales est soumise à la contrainte de la taille de l'acide nucléique et il a été montré que seules les molécules faisant la moitié ou le quart de la taille du génome viral pouvaient être encapsidées de façon stable dans un double ou un simple icosaèdre (Frischmuth et al., 2001). Il est suggéré que l'encapsidation des betasatellites aurait été facilitée par l'intégration de séquences riches en adénosine (région A-Rich) dans ces molécules pour leur permettre d'atteindre la moitié de la taille du génome viral (Bridson and Stanley, 2006). Il a été montré pour l'AYVB que la forme simple brin était présente dans des particules immunoprécipitées avec des anticorps dirigés contre la protéine de capsid virale, ce qui suggère que ces molécules sont encapsidées dans la protéine de capsid virale (Saunders et al., 2000). De plus, les betasatellites sont transmis par *B. tabaci*, ce qui suggère fortement leur encapsidation dans la protéine virale qui est déterminante pour la transmission des virus par *Bemisia*.

Les betasatellites se répartissent généralement en deux grandes catégories isolées phylogénétiquement : ceux isolés à partir d'hôtes de la famille Malvacée, et ceux provenant d'hôtes non Malvacées. Ils sont trouvés en Afrique, et de façon majoritaire en Asie du Sud-Est et ce qui indique que cette région pourrait être le centre d'origine des betasatellites (Nawaz-ul-Rehman and Fauquet, 2009).

Les complexes begomovirus-betasatellite se sont révélés être responsables d'un grand nombre de maladies économiquement importantes en Afrique et en Asie. Du fait des caractéristiques supplémentaires qu'apportent les betasatellites aux virus assistants (augmentation de la gamme d'hôte, augmentation des symptômes...), l'association d'un betasatellite avec un virus infectant une grande culture peut avoir un impact économique important. C'est ce qui s'est passé au début des années 90 au Pakistan avec l'association CLCuMV/CLCuMB. Le même betasatellite associé au cotton leaf curl Burewala virus (CLCuBuV) est impliqué dans le contournement de la résistance des variétés de coton (Amrao et al., 2010). Généralement les begomovirus sont associés à des betasatellites entiers. Cependant il existe quelques exemples de virus qui ont été retrouvés en présence de génomes de betasatellites défectifs qui font entre 426 et 1248 pb. Le point commun est qu'il

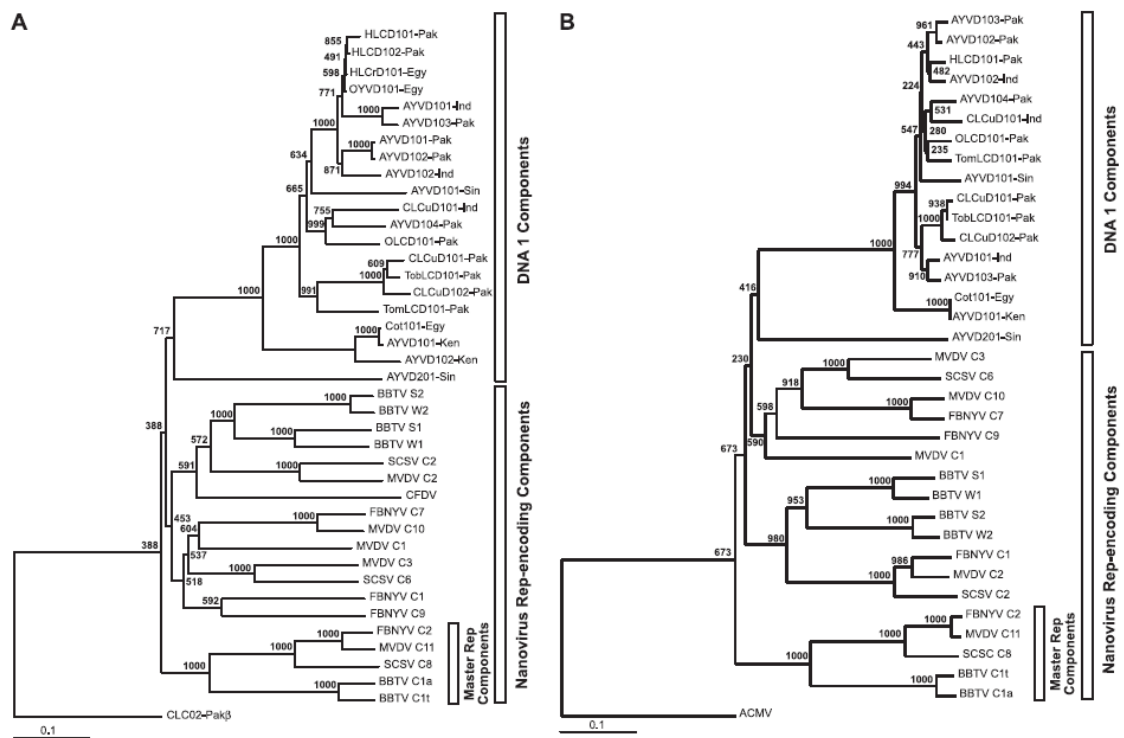


Figure 5: Neighbor-joining phylogenetic dendrograms based on alignments of the complete nucleotide sequences of DNA 1 components (A), the predicted amino (Bridson et al., 2004).

leur manque tous une partie ou la totalité du gène betaC1 (Dry, 1997, Briddon, 2003, Patil and Dasgupta, 2006).

4.2.2. Les Alphasatellites

Les alphasatellites sont des molécules d'ADN simple brin circulaire d'environ 1.3kb, soit la moitié de la taille du génome de leurs begomovirus assistants. Elles sont composées d'une région riche en adénine, d'une structure en épingle à cheveux qui porte l'origine de réplication (TAGTATTAC) et d'un ORF qui code pour une protéine Rep (Figure 4) nécessaire à leur réplication (Kon et al.; Saunders and Stanley, 1999). L'utilisation de mutant déficient pour la Rep a montré qu'ils n'étaient pas répliqués par le virus assistant (Kon et al., 2009). Ils sont donc autonomes pour leur réplication. Cependant, ils requièrent le virus helper pour le mouvement dans la plante et la transmission par *B. tabaci* (Briddon et al., 2004; Mansoor et al., 1999; Saunders and Stanley, 1999; Saunders et al., 2000). On suppose donc qu'ils sont encapsidés dans la protéine de capsid virale, la protéine qui assure le mouvement et qui détermine la transmission par vecteur.

La protéine Rep codée par l'alphasatellite est similaire à celle des para-Rep des Nanovirus. Tout comme les para-Rep des nanovirus, les alphasatellites ne semblent pas jouer un rôle essentiel dans la maladie (Briddon et al., 2004), mais ils ont parfois un rôle de modulateur de l'accumulation du virus assistant (Wu and Zhou, 2005) et des betasatellites (Saunders et al., 2000) par compétition avec ces derniers pour l'encapsidation, atténuant ainsi les symptômes viraux. Dans la nature, les alphasatellites sont souvent associés aux complexes begomovirus-satellites. Il a été montré qu'ils ne pouvaient assister la réplication de betasatellite (Saunders et al., 2000) mais il est probable que la réduction des symptômes observés soit due à la diminution de l'accumulation du betasatellite et donc à une diminution de l'expression de betaC1 (Idris et al., 2011). Plus récemment, Idris et al., (2011) ont identifié un alphasatellite inhabituel qui induit en co-infection avec le tomato leaf curl Oman virus (ToLCOMV), une diminution des symptômes dans les plantes.

Briddon et Stanley (2006) suggèrent que l'origine des alphasatellites serait l'association d'une molécule para-*rep* de Nanovirus à un géminivirus au cours d'infections mixtes. Comme pour les betasatellites, il est supposé que la présence de la séquence A-rich des alphasatellites pourrait s'expliquer par la contrainte de taille nécessaire à l'encapsidation de molécules dans la protéine virale. L'analyse phylogénétique sur la base de leurs séquences nucléotidiques complètes (Figure 5A) et leurs séquences en acides aminés de la Rep (Figure 5B) montre que les alphasatellites sont plus proches entre eux que des composants Rep des Nanovirus. Cela suggère que leur association avec les begomovirus est un phénomène relativement récent (Briddon et al., 2004). A l'origine les alphasatellites sont habituellement trouvés dans l'ancien monde associé à des begomovirus monopartites, toujours en association avec un betasatellite. Mais récemment, des associations incluant des alphasatellites sans betasatellites ont été découvertes dans l'ancien monde, avec un begomovirus monopartite, le tomato leaf

curl Cameroon virus (ToLCCMV) (Leke et al., 2011) et en provenance du Nouveau Monde en association avec un begomovirus bipartite (Paprotka et al., 2010; Romay et al., 2010). Certains alphasatellites codent pour des protéines Rep agissant comme des supprimeurs de silencing ce qui pourrait être un avantage sélectif expliquant leur maintien avec des complexes begomovirus-betasatellites (Nawaz-ul-Rehman et al., 2010).

Le TYLCV n'est pas habituellement détecté avec des satellites en conditions naturelles. Cependant, il a été décrit récemment qu'une souche du Moyen Orient, le TYLCV-Oman, et une espèce proche du TYLCV, le tomato yellow leaf curl Mali virus (TYLCMLV) ont été détectées en conditions naturelles en présence de betasatellite (Chen et al., 2009; Khan et al., 2008). Au Japon, le TYLCV a été découvert associé à un alphasatellite (Shahid et al., 2014). Par contre, il a été montré en conditions artificielles que le TYLCV était capable de trans-répliquer des betasatellites africain et asiatique, d'origines génétiques très éloignées et de les transmettre par vecteur et que cela se traduisait par une forte augmentation des symptômes du TYLCV (Ito et al., 2009; Kon et al., 2009; Ueda et al., 2012; Zhang et al., 2009). Le TYLCV étant un virus invasif responsable d'une importante maladie sur tomate, il pourrait se retrouver en co-infection avec des satellites locaux ou malencontreusement introduits dans des zones de cultures actuellement indemnes de satellites. Comme nous l'avons vu, l'association virus-satellite ne peut être expliquée que par les bénéfices apportés par le satellite au virus assistant. On ne sait donc pas précisément ce qui permet le maintien des associations virus-satellites. A ce jour, bien que nous ayons des informations sur sa capacité à assister des alpha et des betasatellites, nous ne savons rien de la capacité du TYLCV à maintenir des satellites au cours du temps ni du risque encouru par une telle rencontre.

5. Objectifs de la thèse

L'objectif de cette thèse est d'estimer la capacité de maintien de satellites par le TYLCV et d'étudier les facteurs impliqués dans ce maintien.

Nous avons pour cela cherché à savoir si les dynamiques d'accumulation des satellites par rapport à celle du TYLCV étaient favorables à leur maintien intra plante, et entre plante par transmission par vecteur. Pour cela nous avons infecté des plantes de tomate avec différentes combinaisons de virus et satellite et mesuré jusqu'à des temps tardifs (150 jours post inoculation) les accumulations de virus et de satellites et les taux de transmission par *B. tabaci*.

La co-infection cellulaire étant un facteur important pour l'assistance des satellites par le virus, nous avons regardé par FISH si la localisation cellulaire des satellites par rapport à celle du TYLCV était favorable au maintien des associations étudiées.

La MOI d'un virus est un paramètre défini comme étant le nombre de particules virales qui doivent pénétrer et infecter efficacement chaque cellule durant la colonisation d'un hôte. Les satellites étant encapsidés dans des capsides composées de la même protéine que les

génomés viraux, ils seront tous considérés comme des virions identiques. Il faudrait donc que la MOI soit supérieure à 2 pour permettre la co-infection effective d'une même cellule par à la fois, le virus et un satellite. La MOI du TYLCV ou même des begomovirus n'est pas connue. Son estimation permettra d'évaluer la capacité de co-infection cellulaire du TYLCV avec des satellites. Ce résultat sera mis en regard avec les observations de co-infection cellulaires par FISH et les accumulations relatives de virus et de satellite pour discuter des possibilités de maintien.

Les résultats obtenus permettront de faire une prédiction sur la ou les associations TYLCV-satellites les plus dommageables en fonction de l'impact négatif sur la plante et une estimation de la capacité de maintien de l'association du TYLCV avec chaque satellite. Pour prévenir ces risques d'association, il est prévu de mettre au point un outil de diagnostic efficace qui permette le contrôle à l'introduction du matériel végétal pour la détection des différents satellites de begomovirus.

CHAPITRE I : ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES ADN DU TYLCV ET DES SATELLITES MAINTENUS DANS LES PLANTES AU COURS DU TEMPS

1. Introduction

Dans sa définition, un satellite est décrit sous l'angle de son besoin vital d'un virus assistant. Il est donc évident que ce virus a un effet positif sur la fitness du satellite. Par contre la définition ne dit rien sur l'effet du satellite sur la fitness du virus assistant, effet qui peut être positif, négatif ou neutre (voir paragraphe 2.2 de l'introduction). C'est pourtant cet aspect des satellites qui nous intéresse dans cette thèse pour comprendre ce qui fait qu'un satellite réussisse à se maintenir en présence de son virus assistant. Cette question a évidemment une portée générale pour expliquer comment certaines associations observées en conditions naturelles peuvent se maintenir en absence d'un effet bénéfique évident pour le virus assistant. La question prend encore un tout autre relief avec des satellites qui ont été décrits comme ayant un effet délétère sur l'accumulation du virus et sur sa transmission. C'est le cas par exemple de l'association CMV/ARNsat, un modèle très étudié, et trouvé en conditions naturelles notamment en France et en Espagne. Outre la recherche de facteurs explicatifs du maintien d'associations observées en conditions naturelles, nous nous intéressons dans le cadre de cette thèse à la capacité de maintien d'une association qui pour le moment n'existe pas en conditions naturelles mais qui pourrait avoir des conséquences agronomiques graves en cas d'apparition.

Certains begomovirus comme le TYLCV, le TYLCSV, les ToLCV d'Afrique australe, ne sont pas connus pour assister des satellites en conditions naturelles (Briddon and Stanley, 2006; Rey et al., 2012). Pourtant il a été démontré que le TYLCV en était capable et que cette association pouvait, dans certains cas, représenter un risque pour des cultures d'importance économiques (Ito et al., 2009; Ueda et al., 2012; Zhang et al., 2009). Il paraît important dans ces conditions d'étudier la nature des interactions qui existent entre des virus de ce type et des satellites qu'ils pourraient rencontrer. Outre l'intérêt agronomique que cela peut apporter, l'étude d'un modèle qui n'est pas connu pour exister en conditions naturelles permet d'appréhender les conditions nécessaires à un ADN étranger pour devenir un satellite. Nous avons choisi d'étudier l'association entre le TYLCV, un begomovirus invasif responsable de maladies graves sur tomate notamment dans le pourtour méditerranéen (Díaz-Pendón et al., 2010), et deux types de satellites (alphasatellite et betasatellite) présents en Afrique subsaharienne. L'importance agronomique de ce virus, son caractère invasif et le risque d'introduction de satellites dans le pourtour méditerranéen en font un bon modèle pour évaluer et identifier des facteurs déterminant le maintien de satellites avec un virus.

Nous avons choisi de travailler avec la souche Mild du TYLCV, le cotton leaf curl Gezira betasatellite (CLCuGB), le cotton leaf curl Gezira alphasatellite (CLCuGA), et l'okra leaf curl Burkina Faso alphasatellite (OLCBFA). Ces satellites ont été isolés lors d'un échantillonnage sur

Tableau 3: Caractéristiques de virus et satellites du Burkina Faso utilisés dans cette étude.

Isolats viraux associés	Nom	Acronyme	Taille (nt)	Numéro d'accèsion
	Cotton leaf curl Gezira virus-Niger [Burkina Faso:Pô:Okra1:2008]	CLCuGV-NE [BF:Pô:Ok1:08]	2770	FN554531
CLCuGV-NE [BF:Kap:Ok2:08]	Cotton leaf curl Gezira betasatellite- [Burkina Faso:Kampala : Okra1-2:2008]	CLCuGB- [BF:Kap:Ok1-2:08]	1347	FN554575
CLCuGV-NE [BF:Kap:Ok7:08]	Cotton leaf curl Gezira alphasatellite- [Burkina Fas:Kampala:Okra7:2008]	CLCuGA- [BF:Kap:Ok7:08]	1387	FN554580
CLCuGV-NE [BF:Pô:Ok1:08]	Okra leaf curl Burkina Faso alphasatellite-[Burkina Faso:Pô:Okra1:2008]	OLCBFA- [BF:Pô:Ok1:08]	1353	FN554581

des cultures de gombo (Okra, *Abelmoschus esculentus*) dans différents sites au Burkina Faso (Tiendrébéogo et al., 2010). Ils ont été trouvés en association avec le cotton leaf curl gezira virus (CLCuGV). La quasi-totalité des échantillons qui étaient infectés par le CLCuGV contenaient le betasatellite. Par contre les alphasatellites n'ont été détectés que dans un tiers des échantillons. La dynamique d'accumulation du virus et des satellites a été suivie dans des combinaisons d'association décrites en conditions naturelles: virus+betasatellite, virus+alphasatellite, virus+alphasatellite+betasatellite.

Ce chapitre se compose de trois parties :

- Une première partie est consacrée à la description du modèle d'étude. Nous avons testé les constructions agroinfectieuses des satellites pour leur capacité à générer une infection sur gombo ou coton avec leur virus assistant homologue et sur tomate avec le TYLCV.
- Après avoir décrit le modèle d'étude, nous présentons la dynamique d'accumulation du virus et des satellites par une approche de PCR quantitative (qPCR) et un test de l'efficacité de transmission du virus et des satellites à l'aide du vecteur naturel *B. tabaci*. Ces résultats sont présentés sous forme d'un article que nous avons rédigé pour soumission à *Virus Research*.
- La dernière partie est consacrée à des résultats complémentaires. Alors que les résultats consignés dans le projet d'article concernent principalement l'aspect quantitatif des ADNs du virus et des satellites, les résultats complémentaires s'intéressent davantage à la nature de ces ADNs. Les ADNs des begomovirus trouvés *in-planta* sont principalement sous la forme d'ADN circulaire simple brin, qui est la forme encapsidée, et dans une moindre mesure de la forme d'ADN circulaire double brin qui correspond à la forme répliquative. Nous avons effectué des analyses par Southern blot pour voir quel était l'effet des satellites sur les profils d'ADN viraux au cours du temps et quels étaient les profils des ADN de satellites à différents stades de l'infection. L'ensemble des résultats obtenus a fait l'objet d'une discussion.

2. Infectivité des satellites avec le CLCuGV et le TYLCV

Les génomes entiers de CLCuGV, CLCuGB, CLCuGA et OLCBFA (

Tableau 3) ont été clonés dans le plasmide PGEMT (Tiendrébéogo et al., 2010). Les constructions agroinfectieuses de ces clones sont décrites dans le projet d'article qui fait l'objet de la deuxième partie de ce chapitre (paragraphe 3). Ces constructions ont été testées sur des plantes de coton, de gombo et de *Nicotiana benthamiana* pour le CLCuGV et le CLCuGB, et sur tomate, *N. benthamiana*, et *Datura stramonium* pour le TYLCV et les 3 satellites.

Tableau 4: Résultat d'inoculation de virus et de satellite sur différentes plantes hôtes.

Clones inoculés	Méthode d'inoculation	Variété	Date d'inoculation après semis (jours)	Taux de réussite Satellite/Virus/ Nombre de plante inoculées
CLCuGV+CLCuGB	Biolistique	Coton	40	0/0/20
	Agro-Inoculation	Coton	15	0/0/20
	Biolistique	Gombo	15	3/3/40
	Agro-inoculation	Gombo	15	0/0/20
	Agro-inoculation	Nicotiana benthamiana	21	0/0/18
TYLCV+CLCuGB	Agro-inoculation	Tomate	15	3/9/10
	Agro-inoculation	Datura stramonium	20	6/6/6
	Agro-inoculation	Nicotiana benthamiana	20	9/9/10
TYLCV +CLCuGA	Agro-inoculation	Tomate	15	5/10/10
TYLCV + OLCBFA	Agro-inoculation	Tomate	15	5/10/10

Tableau 5 : Amorces et condition pour la PCR multiplexe pour la détection de CLCuGV et CLCuGB.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Condition de PCR
CLCuGV-84	5'-CTGTCCAATCAGAACGCGC-3'	95 °C pendant 15 min suivit de 30 cycles de 30 s à 94°C, 90 s à 54 et 60 s à 72°C.
CLCuGV-488revco	5'-TACATTCGGTACATCCTCGG-3'	
Beta03	5'-CTCTCCTATTTCCGGTGAAAC-3'	
beta04	5'-AGCTGGGACCCACCAATTC-3'	

2.1. Matériel et méthodes

Les plantes ont été semées et repiquées dans des chambres de culture d'un local de confinement de niveau de sécurité 3 (NS3). Les conditions de culture sont les mêmes que celles décrites dans l'article (paragraphe 3).

2.1.1. Agro-inoculation de combinaisons virus/satellite sur les différents hôtes.

Les conditions d'agro-inoculation du virus et des satellites sont les mêmes que celles décrites dans l'article (paragraphe 3). Brièvement, chaque agro-bactérie est cultivée pendant une nuit dans un milieu LB sélectif un milieu LB sélectif en présence d'antibiotiques. Après mesure des densités optiques, les cultures sont mélangées de sont mélangées de manière à ce que les différents clones se retrouvent à la même concentration dans le mélange. Les dans le mélange. Les plantes de coton, de gombo, de *N. benthamiana* et de tomate sont agro-inoculées par infiltration inoculées par infiltration de la suspension bactérienne, tandis que les plantes de *D. stramonium* sont agro-inoculées par sont agro-inoculées par piqûre dans la tige. Les combinaisons de clones inoculés sont données dans le dans le

Tableau 4. Les symptômes sont notés 30 jours après inoculation et la présence des clones inoculés est vérifiée par PCR multiplexe (kit Qiagen Multiplex PCR) pour le CLCuGV et le CLCuGB (amorces et conditions décrites dans le [Tableau 5](#)) et par qPCR pour le TYLCV et les satellites (conditions de qPCR décrites dans l'article, paragraphe 3). Les extractions d'ADN ont été effectuées avec un protocole de Dellaporta modifié, qui est le protocole dit « classique » ([Tableau 7](#)).

2.1.2. Co-inoculation du CLCuGV et du CLCuGB par biolistique sur coton et gombo

Le protocole détaillé est fourni dans l'**Annexe 1**.

Co-précipitation d'ADN sur des microbilles d'or

Un mélange de 25 mg de microbilles d'or de 1 µm de diamètre et 100 µl de spermidine 0.05M est agité modérément avec un vortex (vortexé) puis soniqué à 50-60Hz avec une amplitude de 40. Le mélange d'ADN de CLCuGV et de CLCuGB, soit excisé du plasmide, soit conservé en tandem dans le plasmide, est ajouté à raison de 100 µg dans 50 µL puis vortexé très modérément pendant 5 secondes tout en ajoutant goutte à goutte 100 µL de CaCl₂ 1M froid. Après une incubation de 10 min à température ambiante et une centrifugation de 15 secondes à 12000 rpm, le surnageant est éliminé. Le culot est lavé 3 fois dans de l'éthanol absolu froid. Les billes d'or recouvertes d'ADN sont transférées dans une solution de PVP à 0.05mg/ml.

Préparation des cartouches

Les cartouches sont formées avec des tubes en plastique de type Teztel qui sont stérilisés par 2 ou 3 lavages à l'éthanol absolu, puis séchés à l'aide d'azote liquide. A l'aide du kit seringue de Biorad, le mélange, contenant les billes d'or remises en suspension, est réparti dans la partie

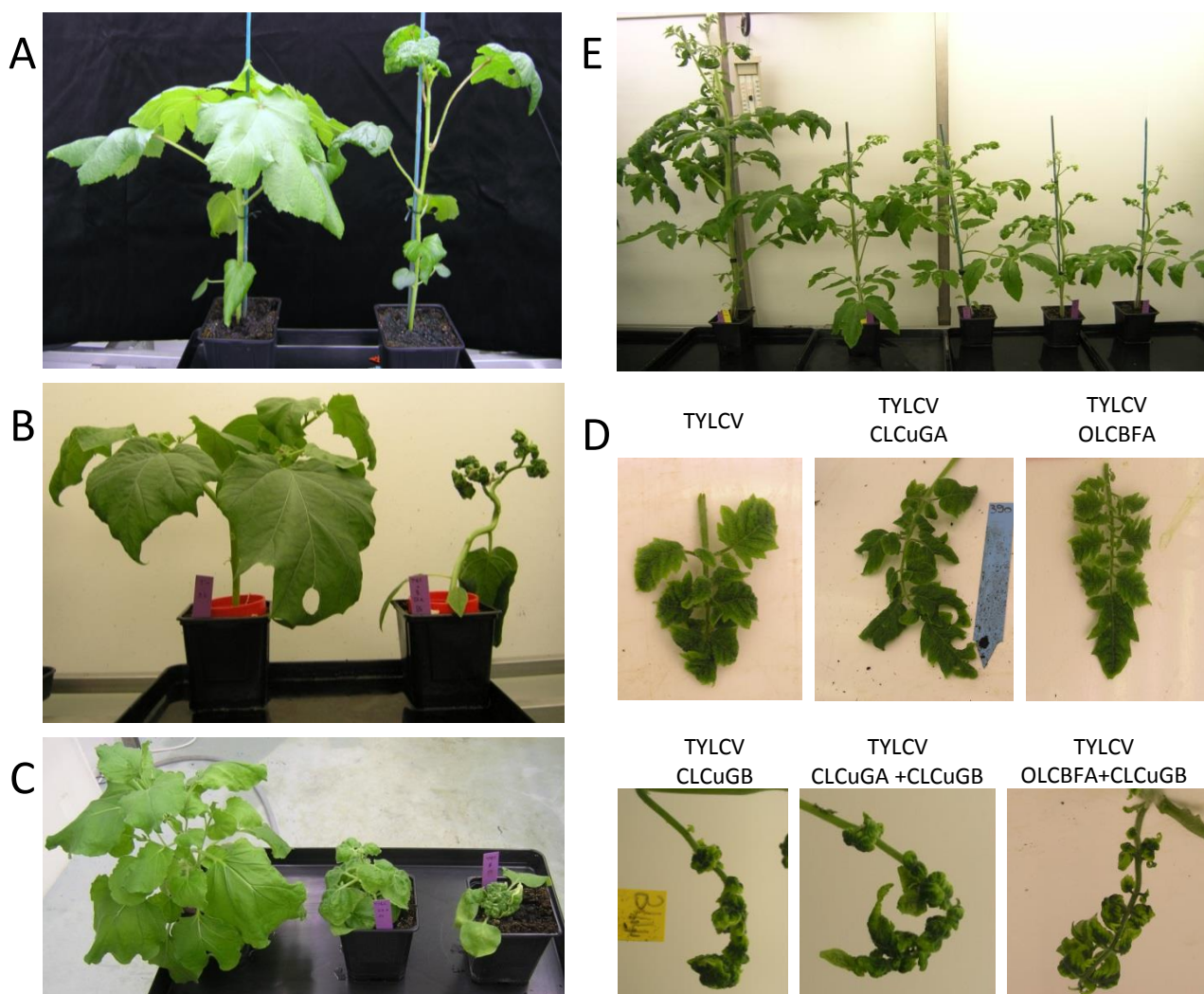


Figure 6: Symptômes provoqués par les différents traitements Virus-satellites 32 jours après inoculation. (A) : Gombo sain à gauche ou inoculé par le CLCuGV + CLCuGB à droite. (B) : Datura sain ou inoculé par le TYLCV + CLCuGB et (C) : *N. benthamiana* sain, inoculé par le TYLCV seul ou le TYLCV + CLCuGB. De gauche à droite, tomate saine, inoculé par TYLCV, TYLCV + OLCBFA, TYLCV + CLCuGB, TYLCV + CLCuGB + OLCBFA (E).

centrale du tube Teztel. On laisse les billes reposer 2 min puis on les sèche 5 min à l'aide d'azote liquide. Les cartouches sont conservées à -20°C jusqu'à utilisation.

Bombardement

Le bombardement a été effectué sur la face inférieure des cotylédons de jeunes plantes de coton et de gombo âgées de 3 semaines. Le nombre de plantes inoculées par espèce et par test est donné dans le

Tableau 4

. Les symptômes sont observés après 30 dpi.

2.1.3. Transmission par vecteur

La transmission du couple CLCuGV/CLCuGB par le vecteur *B. tabaci* a été testée en utilisant le gombo comme plante source et le gombo et le coton comme plantes tests. Des aleurodes *B. tabaci* de l'espèce putative « Middle East-Asia Minor 1 » (MEAM1 anciennement biotype B) ont été mis en acquisition pendant 2 jours, sur 3 plantes sources de gombo, 30 jours après leur infection avec CLCuGV+CLCuGB; ils ont ensuite été transférés sur une vingtaine de plantes saines de gombo et de coton pour une période d'inoculation de 3 jours. Les plantes ont été testées par PCR 30 jours après la fin de la phase d'inoculation.

2.2. Résultats

Malgré plusieurs tentatives, nous n'avons pas réussi à inoculer le coton par le couple CLCuGV/CLCuGB, ni par agro-CLCuGV/CLCuGB, ni par agro-inoculation, ni par biolistique, ni par transmission à partir de gombo infecté (

Tableau 4). Aucun plant de *N. benthamiana* n'a été trouvée infectée après agro-inoculation. Les plantes ne présentaient aucun symptôme et étaient négatives pour la détection par PCR des deux clones inoculés. En revanche, trois plants de gombo ont pu être co-infectés par la méthode biolistique (

Tableau 4) et la transmission par vecteur a été obtenue pour 3 plantes sur les 20 testées. L'infection du gombo par le CLCuGV et le CLCuGB provoque un allongement des tiges et un enroulement des feuilles vers le bas (Figure 6A).

Le TYLCV et le CLCuGB ont réussi à infecter de façon systémique des plantes des trois espèces testées, tomate, *N. benthamiana*, et *D. stramonium* (Figure 6). Le TYLCV est également capable d'assister la propagation des alphasatellites CLCuGA et OLCBFA dans des plants de tomate. Les symptômes apparaissent environ 15 jours après inoculation quelle que soit la combinaison TYLCV/satellites (Figure 6B-E). Les symptômes observés sur des plants de tomate co-infectés avec le TYLCV et un alphasatellite sont les mêmes que ceux causés par le TYLCV seul. Par contre, le CLCuGB augmente la sévérité des symptômes du TYLCV sur tomate *N. benthamiana* et *Datura*

avec un enroulement très prononcé des feuilles accompagné d'un important gaufrage et d'un rabougrissement des plants (Figure 6B-C). Les plants de tomate co-infectés avec le TYLCV, un betasatellite et chacun des alphasatellites présentent les mêmes symptômes que les plantes co-infectées avec le TYLCV et CLCuGB (Figure 6D-E).

Tableau 6: Taux de réussite d'inoculation de chaque combinaison

	TYLCV	TYLCV+ CLCuGA	TYLCV+ OLCBFA	TYLCV+ CLCuGB	TYLCV+CLCuGA +CLCuGB	TYLCV+OLCBFA +CLCuGB
Réussite de Co-infection	19/22	12/22	5/10	7/12	2/10	5/12
%	86	54	50	58	20	41

Le taux de réussite des bi-infections est plus faible que celui du TYLCV seul (50% contre 80%) et le taux de réussite est encore plus faible pour les tri-infections : 20% pour TYLCV+CLCuGA+CLCuGB et 40% pour TYLCV+OLCBFA+CLCuGB (

Tableau 6).

2.3. Discussion

Nous avons validé le fonctionnement du modèle CLCuGV+CLCuGB en montrant qu'il est infectieux sur son hôte sauvage (gombo). De plus nous avons montré que la transmission de gombo à gombo était possible en utilisant le vecteur naturel des begomovirus, *B. tabaci*. Nous avons aussi validé que le betasatellite CLCuGB et les deux alphasatellites, CLCuGA et OLCBFA, peuvent être assistés par le TYLCV-Mld dans leur infection systémique de la tomate. En dépit du nom qu'il porte, le cotton leaf curl Gezira virus (CLCuGV) et le Cotton leaf curl Gezira betasatellite (CLCuGB) n'ont pas réussi à infecter le coton. Cette incohérence vient du fait que le nom que porte ce virus et ce satellite vient d'une classification par espèce sur la base d'un seuil d'identité nucléotidique défini par l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) et non pas sur une base phénotypique. Le membre type de cette espèce avait été décrit sur coton au Soudan (Idris and Brown, 2002). Le clone de CLCuGV utilisé appartient à la souche Niger. Sa séquence présente plus de 96% d'identité nucléotidique avec les isolats de cette souche et 93 à 96,2% avec des clones isolés en Egypte et au Soudan. Un couple homologue de CLCuGV/CLCuGB a été isolé sur gombo au Mali et ne s'est pas non plus montré infectieux sur coton (Kon et al., 2009). Ces résultats sont cohérents avec la spécificité d'infection qui a été montrée avec deux isolats de cotton leaf curl virus du Soudan l'un venant de coton et l'autre de gombo (Idris and Brown, 2002); les isolats n'étaient capables d'infecter que des plantes de leur espèce d'isolement.

Le TYLCV-Mld assiste les deux alphasatellites et le CLCuGB dans la tomate, *D. stramonium* et *N. benthamiana*. Les deux alphasatellites appartiennent à des espèces différentes et présentent seulement 51,2% d'identité nucléotidique entre eux. Le clone de CLCuGB est très similaire aux clones de betasatellites détectés sur gombo en Afrique de l'Ouest (Niger et Cameroun). Nos résultats confirment la grande plasticité des betasatellites à être transrépliqués par différents begomovirus et notamment par le TYLCV (Kon et al., 2009; Ueda et al., 2012; Zhang et al., 2009), ainsi que celle des alphasatellites à utiliser les fonctions de mouvement et d'encapsidation de différents virus. L'augmentation de la sévérité des symptômes en présence du betasatellite est un phénomène qui est bien connu et abondamment décrit pour de nombreux begomovirus (Saunders et al., 2000, 2004) et plus particulièrement avec le TYLCV-Mild (Ueda et al., 2012) et le TYLCV-IL (Kon et al., 2009; Zhang et al., 2009). De même, l'absence d'effet des deux alphasatellites

sur la pathogénie du TYLCV est également un résultat conforme à la littérature (Bridson et al., 2004; Kon et al., 2009).

Les taux de réussite de coinfection virus/satellite sont plus faibles que ceux du TYLCV seul et ils sont d'autant plus faibles qu'on co-inocule davantage de composants. Selon les études, les taux

Tableau 7: Protocoles d'extraction d'ADN

CLASSIQUE (Dellaporta)	CLASSIQUE + SDS	CLASSIQUE + CHLOROFORME	CLASSIQUE + SDS+ CHLOROFORME
<ul style="list-style-type: none"> Pour 50 ml de tampon 5 ml Tris 1M pH8, 5 ml EDTA 0,5M pH8, 5 ml NaCl 5M, au dernier moment : 0,23 g Na₂SO₃ 500 µL RNase à 10mg/ml 	<ul style="list-style-type: none"> Pour 50 ml de tampon 5 ml Tris 1M pH8, 5 ml EDTA 0,5M pH8, 5 ml NaCl 5M, 5ml SDS 10% au dernier moment : 0,23 g Na₂SO₃ 500 µL RNase à 10mg/ml 	<ul style="list-style-type: none"> Pour 50 ml de tampon 5 ml Tris 1M pH8, 5 ml EDTA 0,5M pH8, 5 ml NaCl 5M, au dernier moment : 0,23 g Na₂SO₃ 500 µL RNase à 10mg/ml 	<ul style="list-style-type: none"> Pour 50 ml de tampon 5 ml Tris 1M pH8, 5 ml EDTA 0,5M pH8, 5 ml NaCl 5M, 5ml SDS 10% au dernier moment : 0,23 g Na₂SO₃ 500 µL RNase à 10mg/ml
<ul style="list-style-type: none"> Ajouter 400 µl de tp→0.1g Broyer Incuber 10 min à 65°C Centrifuger 10 min à 13000rpm Préparer des nouveaux tubes Récupérer 300 µl de surnageant Ajouter 1 µl de glycoblue Ajouter 300 µl d'isopropanol Mélanger doucement par retournement du tube Centrifuger 15 min à 13000 rpm Vider le surnageant Rincer avec 500µl éthanol 70% - Vortexer Centrifuger 10 min 13000 rpm Vider le surnageant et laisser sécher le culot à 60°C pendant 15 à 20 min Reprendre le culot dans 50 µl (pour PCR) ou 250 µl (pour QPCR) d'eau 	<ul style="list-style-type: none"> Ajouter 400 µl de tp→0.1g Broyer Incuber 10 min à 65°C Centrifuger 10 min à 13000rpm Préparer des nouveaux tubes Récupérer 300 µl de surnageant Ajouter 1 µl de glycoblue Ajouter 300 µl d'isopropanol Mélanger doucement par retournement du tube Centrifuger 15 min à 13000 rpm Vider le surnageant Rincer avec 500µl éthanol 70% - Vortexer Centrifuger 10 min 13000 rpm Vider le surnageant et laisser sécher le culot à 60°C pendant 15 à 20 min Reprendre le culot dans 50 µl (pour PCR) ou 250 µl (pour QPCR) d'eau 	<ul style="list-style-type: none"> Ajouter 400 µl de tp→0.1g Broyer Incuber 10 min à 65°C Centrifuger 10 min à 13000rpm Préparer des nouveaux tubes Récupérer 300 µl de surnageant Ajouter une quantité équivalente de chloroforme/isoamylalcool (24 :1) Agiter doucement pendant 5 min Centrifuger 5 min à 13000 rpm Récupérer 300 µl de surnageant Ajouter 1 µl de glycoblue Ajouter 300 µl d'isopropanol Mélanger doucement par retournement Centrifuger 15 min à 13000 rpm Vider le surnageant Rincer avec 500µl éthanol 70% - Vortexer Centrifuger 10 min 13000 rpm Vider le surnageant et laisser sécher le culot à 60°C pendant 15 à 20 min Reprendre le culot dans 50 µl (pour PCR) ou 250 µl (pour QPCR) d'eau 	<ul style="list-style-type: none"> Ajouter 400 µl de tp→0.1g Broyer Incuber 10 min à 65°C Centrifuger 10 min à 13000rpm Préparer des nouveaux tubes Récupérer 300 µl de surnageant Ajouter une quantité équivalente de chloroforme/isoamylalcool (24 :1) Agiter doucement pendant 5 min Centrifuger 5 min à 13000 rpm Récupérer 300 µl de surnageant Ajouter 1 µl de glycoblue Ajouter 300 µl d'isopropanol Mélanger doucement par retournement Centrifuger 15 min à 13000 rpm Vider le surnageant Rincer avec 500µl éthanol 70% - Vortexer Centrifuger 10 min 13000 rpm Vider le surnageant et laisser sécher le culot à 60°C pendant 15 à 20 min Reprendre le culot dans 50 µl (pour PCR) ou 250 µl (pour QPCR) d'eau

de réussite de coinoculation virus/satellite sont très variables. Le taux de réussite de l'infection de plantes par TYLCV-Mild et l' Ageratum yellow vein betasatellite (AYVB) a été décrit comme extrêmement faible sur tomate mais bien plus élevé sur *N. benthamiana* (Ueda et al., 2012). Cela n'est pas surprenant car la plante hôte est connue pour jouer un rôle important dans le fonctionnement du complexe, et que *N. benthamiana* est une plante extrêmement permissive à de nombreuses infections. Les taux de réussite obtenus avec le TYLCV-IL sont très variables (4 à 100%) selon le betasatellite testé (Ito et al., 2009; Zhang et al., 2009). Par contre, pour d'autres virus, les essais de co-infection de begomovirus monopartite avec un betasatellite étaient plus concluants car les auteurs obtenaient en général plus de 80% de réussite (Chen et al., 2009; Kon and Gilbertson, 2011; Kon et al., 2009). Il semble donc que la réussite de la co-infection ne dépende pas seulement du nombre de clones co-inoculés mais aussi des clones ou des espèces utilisés. Nous savons aussi par expérience que le type de construction et le protocole d'inoculation peuvent influencer la réussite de l'agroinfection. Par la suite, nous avons tenu compte des taux de réussite obtenus dans les expériences préliminaires en augmentant systématiquement le nombre de plantes inoculées dès lors que des co-inoculations impliquant des satellites étaient réalisées.

3. Article 1:

Assessing the capacity of tomato yellow leaf curl virus Mild strain to
maintain two alphasatellites and a betasatellite

Déborah CONFLON¹, Cica URBINO¹, Martine GRANIER¹, Fidèle TIENDREBEOGO^{2,3}, Pascal
GENTIT⁴ and Michel PETERSCHMITT¹

Assessing the capacity of tomato yellow leaf curl virus mild strain to maintain two alphasatellites and a betasatellite

Déborah CONFLON¹, Cica URBINO¹, Martine GRANIER¹, Fidèle TIENDREBEOGO^{2,3}, Pascal GENTIT⁴ and Michel PETERSCHMITT¹

¹CIRAD, UMR BGPI, F-34398 Montpellier, France

²Laboratoire de Virologie et de Biotechnologies Végétales (LVBV), INERA, 01 BP 476 Ouagadougou 01, Burkina Faso

³Laboratoire Mixte International Patho-Bios, IRD-INERA, 01 BP 476 Ouagadougou 01, Burkina Faso

⁴ANSES, Plant Health Laboratory, Unité de Bactériologie, Virologie et détection des OGM, 7 rue Jean Dixméras, 49044 Angers Cedex 01, FRANCE

Corresponding author: michel.peterschmitt@cirad.fr

ABSTRACT

Begomoviruses (family Geminiviridae) are frequently detected with alpha- and betasatellites, DNA molecules which depend on the virus for maintenance in plant. Except some begomoviruses like Cotton leaf curl virus which rely on a specific betasatellite for a full symptomatic infection in its natural host plant, most begomoviruses which were frequently detected with satellites do not rely on them for infectivity. Although the maintenance of such associations could depend on the respective accumulation of both the virus and the satellite, the dynamic accumulations of these molecules have poorly been investigated until now. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) is one of the most damaging begomovirus worldwide. The most invasive strains, Mediterranean IL and Mld, were almost never detected in association with satellites, although they were experimentally proved to transreplicate them, particularly betasatellites, with a dramatic increase of the TYLCV virulence. The potential maintenance of satellites with TYLCV in tomato plants was assessed by testing the relative intra-plant accumulation of TYLCV and satellites and the transmission efficiency of satellites by the natural whitefly vector of TYLCV, *Bemisia tabaci*.

Three satellites previously isolated from okra in Burkina Faso, were shown to be transreplicated by TYLCV in tomato plants: Cotton leaf curl Gezira betasatellite (CLCuGB), Cotton leaf curl Gezira alphasatellite (CLCuGA) and Okra leaf curl Burkina Faso alphasatellite (OLCBFA). The

dynamic of TYLCV and satellite DNAs monitored between 11 and 150 days post-inoculation (dpi) by quantitative PCR (qPCR) revealed that alphasatellites did not impact the virus DNA accumulation whereas CLCuGB accumulated at the expense of the virus from 18 dpi. Although the ratio virus:satellite amount varies over time, satellites were maintained in all test plants up to 150 dpi. Transmission with *B. tabaci* from TYLCV+CLCuGB or TYLCV+OLCBFA-infected tomato plants revealed that both satellites were transmitted in more than 50% of TYLCV-infected plants at 32 dpi and in more than 30% of TYLCV-infected plants for CLCuGB at 150 dpi. The possible maintenance of satellites by TYLCV is discussed in the light of these results.

INTRODUCTION

Begomoviruses are circular single stranded plant DNA viruses belonging to the family *Geminiviridae*. The first begomovirus genomes to be characterized comprised two genome components of about 2600 nts (A and B components), and the very first was the genome of *Bean golden mosaic virus*, the type member of begomoviruses (Haber et al., 1981). Ten years later, *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) was the first begomovirus species for which a monopartite genome was reported (Dry et al., 1993; Kheyr-Pour et al., 1991; Navot et al., 1991); the single component was similar to the A component of bipartite begomoviruses. About ten years later, two circle DNA subviral agents of half the size of begomovirus components were detected essentially in association with monopartite begomoviruses but sometimes also with bipartite begomoviruses. As their homology with begomovirus genomes was extremely limited and as they depended on begomoviruses for their propagation —two features consistent with the definition of satellite DNA— they were named betasatellite and alphasatellite. The *Ageratum yellow vein betasatellite* (AYVB) was shown to depend on *Ageratum yellow vein virus* (AYVV) for replication, and encapsidation (Dry et al., 1993; Saunders et al., 2000). Betasatellites encode a multifunctional protein named betaC1 which was reported to enhance symptom expression (Cui et al., 2004; Saunders et al., 2004), to suppress transcription gene silencing and post transcription gene silencing (Cui et al., 2005), and to be involved in virus movement (Patil and Fauquet, 2010; Saeed et al., 2007). Whereas betasatellites do not exhibit any homology with any genome, the alphasatellites are homologous to nanovirus components. Indeed, they encode a replication associated protein (Rep) which is similar to the *Rep* gene of nanoviruses (Saunders and Stanley, 1999). Alphasatellites were often detected in association with begomovirus/ betasatellites complexes (Briddon et al., 2004; Xie et al., 2010). Their effect on helper virus is much less pronounced than that of betasatellites. Unlike betasatellites, alphasatellites do not modulate virus

symptoms except in two instances where alphasatellites were reported to attenuate them (Idris et al., 2011; Wu and Zhou, 2005). Most alphasatellites have no or a very low effect, if any, on the helper virus accumulation (Briddon et al., 2004; Kumar et al., 2015; Kumar et al., 2014). However, a significant decrease has been observed in some cases (Kon et al., 2009; Saunders et al., 2002; Wu and Zhou, 2005). Two alphasatellites, *Gossypium darwinii* symptomless alphasatellite (GDarSLA) and the *Gossypium mustelinum* symptomless alphasatellite (GMusSLA) were shown to have strong gene silencing activities (Nawaz-ul-Rehman et al., 2010).

For some begomoviruses like *Cotton leaf curl virus* (CLCuV), *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV) or AYVV, betasatellites are indispensable for efficient infectivity and wild-type symptom development in their natural host plant (Cui et al., 2004; Mansoor et al., 1999). For other begomoviruses, they are dispensable and are not always found in co-infection with them. Indeed, analysis of field samples and infectivity studies revealed that although *Tomato leaf curl Ghana virus* (ToLCGV) and *Tomato yellow leaf curl Mali virus* (TYLCMLV) could be occasionally associated with betasatellite, they did not require it for induction of disease symptoms (Chen et al., 2009; Kon and Gilbertson, 2012). Finally, there are begomoviruses, particularly those from Mediterranean, Southern African and NW regions, which were never reported in association with betasatellites. This is for example the case of Tobacco leaf curl and tomato leaf curl virus species from the South West Indian Ocean Islands (Lefeuvre et al 2007) and of the TYLCV strains of the Mediterranean Basin, namely Israel (IL) and Mild (Mld). It is presently not clear if the absence of betasatellites with these viruses is merely due to the fact that betasatellites are not present in those geographic regions which would have obviously limited the betasatellite/begomovirus encounters, or if they are not adapted to maintain betasatellites. TYLCV-IL and TYLCV-Mld have been reported to transreplicate efficiently betasatellites from different origin in experimental conditions and always with an increase of symptom severity. TYLCV is the major and most damaging tomato begomovirus and a potential increase of its virulence induced by an invading betasatellite with possible tolerance breaking of the cultivars extensively used in the Mediterranean countries may have dramatic consequences on tomato production. Such a risk cannot be excluded because a Middle Eastern strain of TYLCV (TYLCV-OM) (Khan et al., 2014; Khan et al., 2008) and a TYLCV related species from Mali (TYLCMLV) (Chen et al., 2009) were reported with betasatellites in natural conditions.

However, the capacity of these viruses to maintain satellites has never been investigated. The objective of this study was to address this question by monitoring accumulation dynamics of satellite and viral DNA in plants co-inoculated with the non-betasatellite associated TYLCV-Mld

and various satellite combinations. TYLCV-Mld has been experimentally shown to transreplicate AYVB and assist it for transmission with *Bemisia tabaci*, the natural whitefly vector of begomoviruses. However there has been no quantification of the viral and the betasatellite DNA and the possible impact of an alphasatellite on the betasatellite- TYLCV-Mld complex has not been evaluated. To fill these gaps and assess the possibility of a sustainable association of TYLCV-Mild with satellites tomato plants were co-inoculated with TYLCV-Mld and various combinations of two alpha and one betasatellite from Burkina Faso. Viral and satellite DNA accumulations were monitored overtime between 18 and 150 days post inoculation (dpi) and vector transmission efficiency of satellites was assessed at 32 and 150 dpi.

MATERIAL AND METHODS

Virus and satellites

The Mild strain of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-Mld, accession no AJ865337) isolated from tomato plants (*Solanum lycopersicum*) in Réunion island in 2002 (Delatte et al., 2005) was used as helper virus with three satellites isolated from okra in Burkina Faso (Tiendrébéogo et al., 2010): Cotton leaf curl Gezira betasatellite (CLCuGB, database accession number FN554575), Cotton leaf curl Gezira alphasatellite (CLCuGA, database accession number FN554580) and Okra leaf curl Burkina Faso alphasatellite (OLCBFA, database accession number FN554581).

The full length genomes of alpha- and betasatellites were released from their pGEM-T Easy vector with restriction enzyme (*Pst*I for CLCuGB and CA and *Bam*HI for OA) and ligated as a tandem repeat into the unique corresponding restriction site of pCambiOA300. *Agrobacterium tumefaciens* strain C58 MP90 was then transformed with each of the recombinant plasmid by electroporation.

Plant inoculation, experimental design, and growth conditions

The transformed *A. tumefaciens* clones were grown at 28°C in a liquid LB medium containing kanamycin (50 mg/ml) and gentamycin (20 mg/ml). After about 26 h, when suspensions reached optical densities (OD) of about 3 to 5, the agroinfectious bacteria cultures for TYLCV-Mld and satellites were adjusted to identical ODs with LB medium. The equally concentrated virus and satellite cultures were centrifuged 20 min at 1,000 g and each pellet was resuspended in water (same volume as the pelleted volume) containing 150 mM acetosyringone and 10 mM MgCl₂. For mixed virus-satellite infections the same procedure was used except that the same volumes of equally concentrated virus and satellite containing cultures were mixed before centrifugation. The resuspension volume of the mixed inoculums was such as the concentration of virus containing

Table 1: Primers for the quantification of TYLCV and satellites DNA by real time PCR

Primer name		Primer sequence	Annealing temperature
TYLCV	TYM 1431-F	CTTAAGAAATGACCAGTCTGAGT	60 °C
	TYM 1576-R	AGATTCAACCACAACATCAGG	
Beta	CLCuGB-343-FW	AACCCATTCATTATTTC	52 °C
	CLCuGB-424-Rev	CGTTCATCATAACCATA	
Alpha1	CLCuGA-213-fw	GAATTGAACCCCCATCTGGAGA	60 °C
	CLCuGA-293-rev	CCTAGTTTCTTCTTTTCATGC	
Alpha2	OLCA-FW	ATGAATAAAGATTCACA	50 °C
	OLCA-rev	CAATTCAGACAGACGCT	
25S gene	25SRNA1137 Fw	AGAACTGGCGATGCGGGATG	60 °C
	25SRNA1297Rev	GTTGATTTCGGCAGGTGAGTTGT	

agrobacteria was identical in mixed and single infections. Fourteen day old tomato plants of the susceptible cultivar ‘Monalbo’ (INRA) were agroinfiltrated in cotyledons (Vuillaume et al., 2011). Each of the following combinations of agroinfectious cultures were inoculated to 30 to 125 tomato plants in “Experiment 1”: TYLCV alone (T), TYLCV and each of the three sateellites: TYLCV + CLCuGB (T+B), TYLCV+CLCuGA (T+CA) and TYLCV + OLCBFA (T+OA); and TYLCV with combinations of beta- and alphasatellites (T+B+CA, T+B+OA). The inoculated plants were randomized within 5 blocks in the containment chamber, each block containing 6 to 25 plants of each treatment. Only plants detected positive at 18 dpi for the agroinoculated clones were kept for further samplings. Those plants were re-organized so that each of the five blocks contained 3 to 9 plants of each treatment. Samples were collected at 11, 18, 25 and 32 dpi.

Two subsequent independent experiments including some virus/satellite combinations and sampling dates of “Experiment 1” were conducted. In “Experiment 2”, 30 tomato plants were inoculated with T, T+B or T+CA. In “Experiment 3”, 20 tomato plants were inoculated with T or T+B. Plants were sampled at 18, 32 and 150 dpi.

The negative control consisted of tomato plants inoculated with *A. tumefaciens* clone containing an “empty” plasmid. Tomato plants were grown in containment chambers under 14 h light at 26°C, and 10 h dark at 24°C and irrigated with 15:10:30 NPK+ oligoelements. Each plant sample from which DNA was extracted for real time PCR analysis consisted of 5 leaf discs of 5 mm diameter collected from the youngest unfolded leaf.

Extraction of total DNA

Total DNA was extracted using a modification of a reported protocol (Dellaporta et al., 1983): each leaf sample was ground in 400 µL of 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), containing 50 mM EDTA, 500 mM NaCl and 1% (weight/vol) SDS. The extract was incubated at 65°C for 10 min and centrifuged at 16,000 g for 10 min. One volume of isopropanol was added to the supernatant. The mix was centrifuged at 16,000 g for 20 min and the pellet washed with 70% ethanol. The pelleted DNA was resuspended in 50 µL sterile water and stored at –20°C if not used immediately.

Quantitative PCR conditions

The total amount of virus and satellite in each plant sample was determined by SYBR Green real-time (qPCR). The 10 µL reaction mixture consisted of 5 µL LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBR green I kit Mix (Roche, Germany), 0.3 µM of each primer (Table 1), and 2 µL of a 1/100 dilution of the template DNA extract. TYLCV primers were designed in the AC2/AC3

region, CLCuGB primers in the betaC1 gene, and alphasatellite primers in their *Rep* gene. Two technical replicates per sample were amplified. Amplification conditions were 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 10 s at 95 °C, 30 s at annealing temperature (Table 1), and 20 s at 72°C. To standardize all measurements of viral and satellite DNA accumulations, the amount of plant DNA in each extracted sample was estimated in parallel with a qPCR test targeting the endogenous 25S RNA gene; the amplification conditions were the same as above except that the time of annealing was 20 s and of elongation 10 s. PCR efficiencies were assessed with standard curves obtained by the amplification of serial tenfold dilution of the recombinant plasmids containing each target sequence; efficiencies ranged from 88% to 93%. All PCR fluorescence data were analyzed using the 2nd derivative max function of the LightCycler480 Software and the program LinRegPCR, (Ruijter et al., 2009) coupled to Pfaffl's quantification model (Pfaffl, 2001).

The starting concentration of the target, called N0, is expressed in arbitrary fluorescence units per sample. N0 was calculated for each well from the values of the fluorescence threshold (Ft), the mean PCR efficiency of the corresponding qPCR plate (E_{mean}) derived from the individual well efficiencies, and the fractional number of cycles needed to reach the fluorescence threshold (Ct):

$$N0 = Ft / E_{\text{mean}}^{Ct}$$

After checking key quality control points, technical replicates, and negative and positive controls, the N0 values of the targets (virus or satellite) were calibrated with the N0 of the endogenous 25S RNA gene determined for each sample. The calibrated value (CV) was calculated as follow:

$$CV = \frac{N0 \text{ target}}{N0 \text{ 25s}}$$

As CV is the ratio of numbers having the same arbitrary fluorescence unit, CV has no unit and was used only to define relative DNA accumulation.

Finally, as SYBRTM Green I is a dsDNA intercalating molecule (Zipper et al., 2004), the fluorescence of an amplicon depends on its size. To weight the CV values according to the size of the satellite and virus amplicons, a size-relative CV (CV_r) was calculated:

$$CV_r = \frac{CV}{\text{size of the amplified fragment (bp)}}$$

A positive detection threshold was determined for the virus and the satellites as 3 times the mean N0 of 11 healthy plant samples tested with the corresponding primer pairs.

Insect transmission by the vector *B. tabaci*

The efficiency of whitefly transmission of TYLCV, OLCBFA and CLCuGB was assessed by determining the percentage of infected plants following inoculation with female whiteflies in three different experiments. In “Experiment V1”, *B. tabaci* individuals were from a Q2 type population of the putative species Mediterranean (Med), originally collected from Hyeres in the South east region of France) and reared on cucumber plants before the test. Transmission test were performed with source plants exhibiting the following infection status: TYLCV alone, TYLCV + OLCBFA, or TYLCV-CLCuGB. For each infection status, approximately 400 young adults were given an acquisition access period (AAP) of 48h on each of three individually caged infected tomato plants 29 dpi. At the end of the AAP, two females selected after observation under a stereomicroscope were transferred to 14-day old tomato plants for a 120h- inoculation access period (IAP). At 30 dpi, presence of TYLCV and CLCuGB were detected from symptom observation. For the identification of OLCBFA-infected tomato plants, detection was performed by qPCR using specific primers (Table 1).

The source plants used in “Experiment V2” were infected with TYLCV or TYLCV+CLCuGB. The experimental conditions were the same as those of “Experiment 1” except that the *B. tabaci* population was of the Q1 type of the putative Med species, a population originally collected from Angers in the North west region of France and reared on cucumber plants before the test.

The experimental conditions of “Experiment V3” were the same as “Experiment V2” except that source plants were tested following different infection periods, 32 and 150 dpi, and that three females instead of two were used for each test plants; two females were transferred to test plants as in the previous experiment and a third one from the same AAP population was transferred the following day.

Statistical analysis

All statistical analyses concerning virus and satellite accumulations were performed using R Studio software, version 3.0.3. (R_Development_Core_Team, 2010). At each of the four sampling time points (11, 18, 25 and 32 dpi), ANOVA tests were used to compare within host DNA accumulation (after a log transformation of CVr data) of each target between between treatments, and to compare different targets within plants. The nature and results of each statistical test are indicated in the section “Results”. The transmission efficiencies were analysed with a generalized

Table 2: Infection rate of agroinoculation of TYLCV with different satellites.^a :Number of plants infected with satellites/Number of inoculated plants (percentage)

Inoculum	Infectivity ^a
Mock (empty plasmid)	0/20
TYLVC	24/30 (80%)
TYLCV+CLCuGA	23/50 (46%)
TYLCV+OLCBFA	36/50 (72%)
TYLCV+CLCuGB	41/50 (82%)
TYLCV+CLCuGB+CLCuGA	34/125 (27%)
TYLCV+CLCuGB+OLCBFA	37/75 (49%)

Table 3 : Number of plants tested by qPCR per treatment and per experiment. T: TYLCV; T+B : TYLCV+CLCuGB; T+CA : TYLCV+CLCuGA; T+OA: TYLCV+OA; T+B+CA : TYLCV+CLCuGB+CLCuGA; T+B+OA : TYLCV+CLCuGB+OA

	dpi	T	T+B	T+CA	T+OA	T+B+CA	T+B+OA
Experiment 1							
	11	23	17	23	21	17	21
	18	22	22	20	21	22	23
	25	21	23	22	21	24	24
	32	23	23	23	22	22	22
Experiment 2							
	18	5	17	18			
	32	5	19	20			
	150	5	15	14			
Experiment 3							
	18	14	12				
	32	13	12				
	150	16	12				

linear model (GLM) and a hierarchical GLM model with a binomial distribution (JMP 11, SAS Institute Inc, Cary, North Carolina, USA).

RESULTS

1. *Virus and satellite infection*

Tomato plants were agroinoculated with TYLCV-Mld, alone (T) or with the following satellites: betasatellite CLCuGB (T+B), alphasatellite CLCuGA (T+CA), alphasatellite OLCBFA (T+OA), CLCuGB + CLCuGA (T+B+CA), or CLCuGB + OLCBFA (T+B+OA). The DNA level of each component was assessed in the plants of each treatment sampled at 11, 18, 25 and 32 dpi. The expected infection pattern was obtained in 80% of the plants inoculated with T and T+B, in 46% with T+CA, in 72% with T+CA, 27% with T+B+CA and 49% with T+B+OA (Table 2). Only plants exhibiting the expected infection profile in each treatment at 18 dpi were used for symptom observation and growth measures at 32 dpi (Table 3). The typical yellow leaf curl symptoms observed at 32 dpi on plants infected with TYLCV alone (Fig. 1) were not distinguishable from those of plants co-infected with alphasatellites (T+CA, T+OA). However, any plant containing the betasatellite (T+B, T+B+CA, T+B+OA) exhibited a typical symptom pattern consisting of severe downward leaf curling and stunting (Fig.1).

The impact of viral and satellite infections on plant growth was estimated by measuring plant heights at 32 dpi (Fig.2, Experiment 1). The plants of the T and T+OA treatments were not significantly different from the mock agroinoculated plants whereas the plants of the other treatments were significantly smaller. The height of the plants infected with TYLCV alone was similar to that of the plants coinfecting with T+OA or T+CA but significantly higher than that of plants coinfecting with CLCuGB (T+B, T+B+CA and T+B+OA). Thus, the plants in which the betasatellite was detected were in average 25% smaller than plants infected with the virus alone.

2. *Comparison of the accumulation dynamics of TYLCV and satellite DNAs*

Using the calibrated fluorescence values CV_r derived from the qPCR tests, the level of viral and satellite DNAs within plants was compared within and between treatments (Fig. 3). Only plants which proved positive by qPCR for the detection of all agroinoculated clones at 18 dpi were used for DNA quantifications and analysis (Table 3). At 11dpi, the level of TYLCV DNA was higher than that of any satellite DNA irrespective of the treatment. In many plants, at least one of the

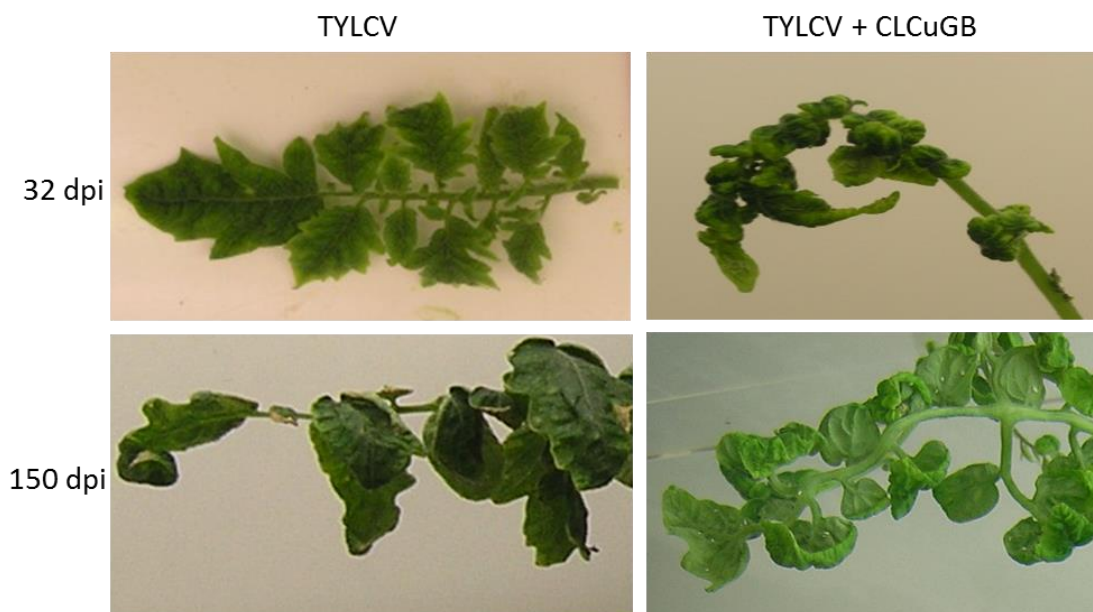


Fig. 1: Leaf symptoms observed on tomato plants infected with TYLCV or with TYLCV + CLCuGB at 32 and 150 dpi.

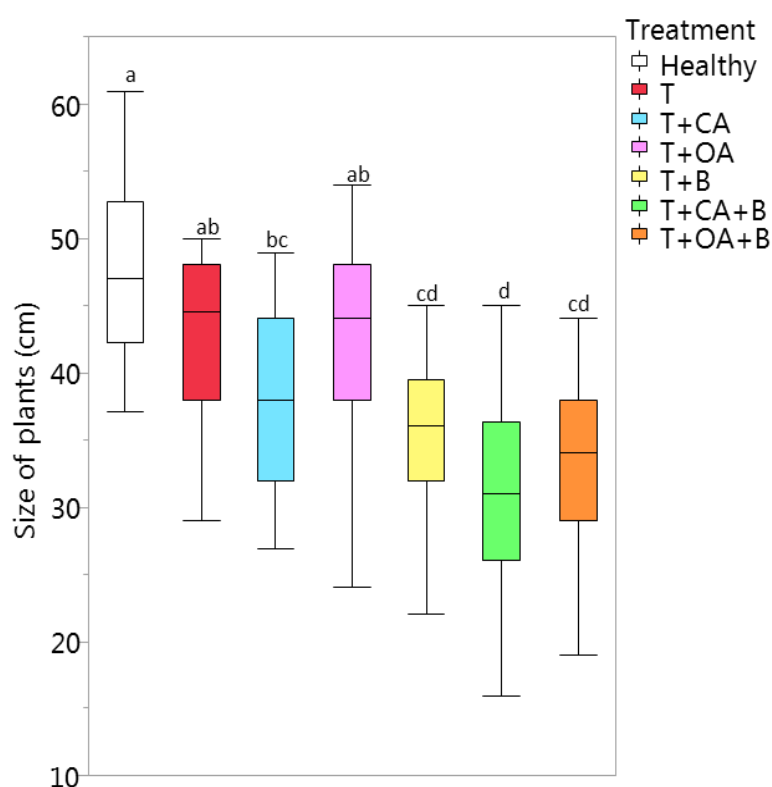


Fig. 2: Growth estimation at 32 days post inoculation of tomato plants infected with TYLCV and different combination of satellites.

TYLCV (T),
 TYLCV+CLCuGB (T+B),
 TYLCV+CLCuGA (T+CA),
 TYLCV+OLCBFA (T+OA)
 TYLCV+OLCBFA+CLCuGB
 (T+OA+B),
 TYLCV+CLCuGA+CLCuGB
 (T+CA+B).

Healthy plants were used as control. Boxplots with different letters indicate significant differences between treatments (Tukey's test, $p=0.05$).

inoculated components was below the positive detection threshold at 11 dpi: 43% in T+CA, 38% in T+OA, 11% in T+B, 25% in T+B+CA, 47% in T+B+OA. Interestingly, the plants which were negative for the detection of alphasatellites (25 to 43% depending on the treatments) were more frequent than those which were negative for the detection of the betasatellite (0 to 16%) or TYLCV (4 to 8%). At 18, 25 and 32 dpi, the amount of CLCuGB DNA was strikingly higher than that of TYLCV except in treatment T+B+OA at 18 and 32 dpi (Fig. 3). Interestingly the dominance of CLCuGB DNA over TYLCV DNA is not only due to a high accumulation of CLCuGB per se, but also because of the low level of TYLCV DNA accumulation in these plants compared to that of plants infected with TYLCV only (T) (Fig 3). Unlike levels of betasatellite DNA which were consistently higher than those of TYLCV DNA at the three last sampling dates, levels of alphasatellite CA was always lower than that of TYLCV DNA except at 32 dpi for treatment T+CA (Fig. 3). The levels of OLCBFA DNAs were above, similar or below that of TYLCV DNA depending on treatment and collection dates.

The highest DNA accumulation of TYLCV was at 18 dpi in all the treatments (Fig 4). The accumulation dynamic of betasatellite DNA was similar between the three treatments (T+B, T+B+CA, T+B+OA) but the highest accumulation was at 25 dpi (Fig. 5). The accumulation dynamic of the CA alphasatellite DNA was similar between the two treatments (T+CA, T+B+CA) with a general increase over time (Fig 5). However, the accumulation dynamic of the OA alphasatellite DNA was different between the T+OA and T+B+OA, particularly between the samples collected at 18 and 25 dpi (Fig. 5).

3. *Interactions between alpha- and beta-satellite DNAs*

Interactions between satellites were revealed by comparing their accumulations in association with TYLCV alone or in association with TYLCV and another satellite. Such a comparison revealed that OLCBFA but not CLCuGA had a negative impact on the DNA accumulation of the betasatellite (Fig. 5). Indeed the DNA accumulation of the betasatellite at 32 dpi was significantly lower in plants of treatment T+B+OA compared to plants of treatment T+B. Inversely, the betasatellite had a negative impact on the DNA accumulations of OLCBFA at 25 dpi (Fig.5). The accumulation of CLCuGA was also decreased by the betasatellite at 18, 25 32 dpi but the difference was not significant. Intriguingly, the betasatellite impact was positive on the DNA accumulation of OA at 18 dpi

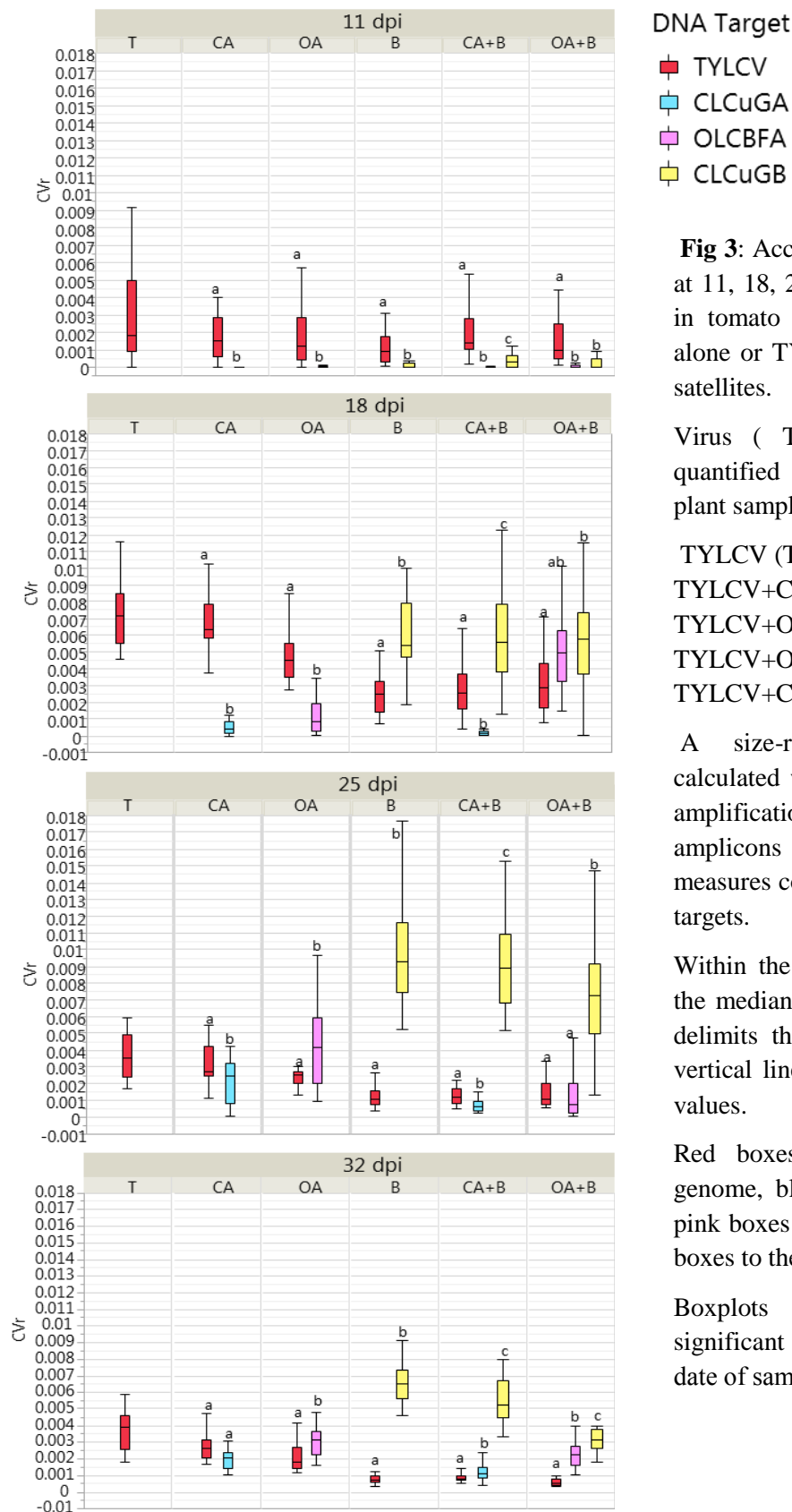


Fig 3: Accumulation of virus and satellite DNA at 11, 18, 25 and 32 days post inoculation (dpi) in tomato plants infected with either TYLCV alone or TYLCV with different combination of satellites.

Virus (TYLCV) and satellite DNA were quantified with real-time PCR on individual plant samples in the different treatments:

TYLCV (T), TYLCV+CLCuGB (T+B),
 TYLCV+CLCuGA (T+CA),
 TYLCV+OLCBFA (T+OA)
 TYLCV+OLCBFA+CLCuGB (T+OA+B),
 TYLCV+CLCuGA+CLCuGB (T+CA+B).

A size-relative calibrated value (CvR) calculated with the fluorescence emitted by the amplification products and with the size of the amplicons provided DNA accumulation measures comparable between virus and satellite targets.

Within the boxes, the horizontal line indicates the median value (50% quantile), the box itself delimits the 25% and 75% quantiles, and the vertical lines represent the normal range of the values.

Red boxes correspond to the TYLCV-Mld genome, blue boxes to the CLCuGA genome, pink boxes to the OLCBFA genome and yellow boxes to the CLCuGB genome.

Boxplots with different letters indicate significant differences between samples at each date of sampling (Tukey's test, $p=0.05$).

4. *Negative impact of alpha- and betasatellites on the DNA accumulation of TYLCV*

The accumulation of TYLCV DNA of plants co-infected with satellites was mostly lower than that of plants infected with TYLCV alone at the three latest sampling dates (Fig. 4). The three satellites could be distinguished by the intensity of their impact on TYLCV DNA accumulation. The highest impact was observed with the betasatellite: in all the treatments including the betasatellite, the accumulation of TYLCV DNA was significantly lower than that in the TYLCV treatment (T) without satellites. Alphasatellites did not modulate this negative impact on TYLCV as the TYLCV DNA accumulation was similar in the three treatments including the betasatellite, irrespective of the sampling date. The second highest impact was observed with OLCBFA. The accumulation of TYLCV DNA in treatment T+OA was significantly lower than that in treatment T at 32 dpi. CLCuGA has no significant impact on TYLCV DNA accumulation. In spite of the deleterious effect of CLCuGB and OLCBFA on the DNA accumulation of TYLCV, the accumulation dynamic of TYLCV was conserved. Indeed, in all the treatments, the highest DNA accumulation of TYLCV was at 18 dpi.

5. *Testing the maintenance of TYLCV and satellites up to five months post inoculation*

In view of the gradual decrease of TYLCV DNA accumulation induced by CLCuGB over the last three sampling times, it was not known if the decrease may continue beyond 32 dpi and eventually induce a decline of TYLCV. Inversely, as TYLCV-Mld is not a satellite-associated begomovirus, it was not known how long its assistance to satellites may continue beyond 32 dpi. To answer these questions, we monitored TYLCV and satellite DNA accumulation at 18, 32 and 150 dpi in two other experiments. In Experiment 2, tomato plants were agroinoculated with T, T+B and T+CA, and in Experiment 3, with T and T+B.

The symptoms observed at 32 dpi on the plants agroinfected in Experiments 2 and 3 were similar to those observed in the first experiment (Fig. 1). The symptoms observed at 150 dpi were milder than those observed at 32 dpi.

Like in Experiment 1, CLCuGB exhibited a deleterious effect on the accumulation of TYLCV DNA at 18 and 32 dpi in both supplementary experiments, 2 and 3 (Fig. 6 and 7). Likewise, as in Experiment 1, CLCuGA did not exhibit any deleterious effect on TYLCV DNA accumulation at 18 and 32 dpi in Experiment 2. The presence of CLCuGA was even beneficial to TYLCV at 18 dpi in (Fig.6). The infectious status of the plants tested at 32 and 150 dpi was identical indicating that neither the virus, nor the satellites have decreased below their detection level. At 150 dpi, the

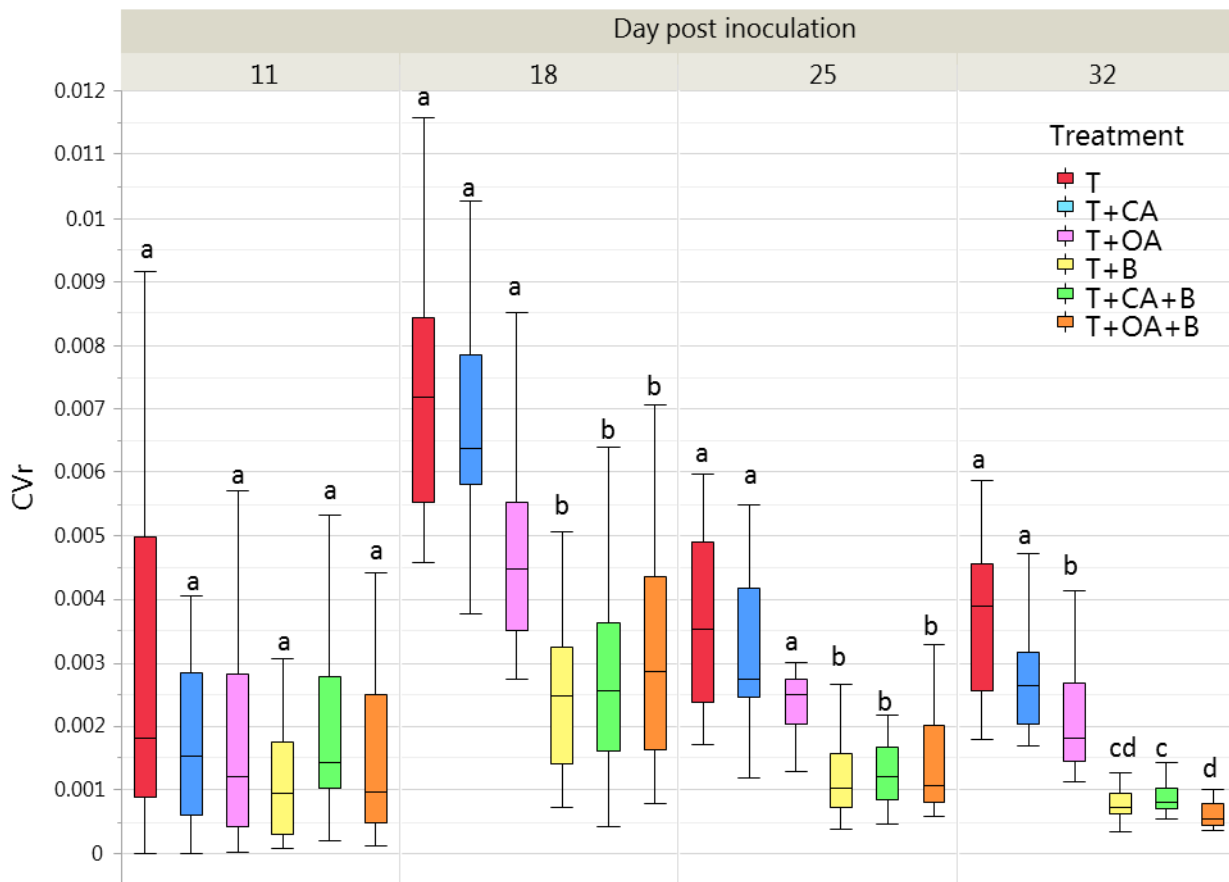


Fig.4: Accumulation of TYLCV DNA at 11, 18, 25 and 32 days post inoculation in tomato plants infected with TYLCV either alone or with different combination of satellites. TYLCV DNA was quantified with real-time PCR on individual plant samples in different treatments: TYLCV (T), TYLCV+CLCuGB (T+B), TYLCV+CLCuGA (T+CA), TYLCV+OLCBFA (T+OA), TYLCV+OLCBFA+CLCuGB (T+OA+B) and TYLCV+CLCuGA+CLCuGB (T+CA+B). DNA accumulation and box plots are as in Figure 3. The color of each treatment is given at the top of each graph. Boxplots with different letters indicate significant differences between samples at each date of sampling (Tukey's test, $p=0.05$).

DNA accumulation of TYLCV was similar in T and T+B treatments in both experiments (Fig. 6 and 7) indicating that the deleterious effect of CLCuGB on TYLCV accumulation detected up to 32 dpi has disappeared at 150 dpi. CLCuGA has no detectable effect on the accumulation of TYLCV DNA at 150 dpi. At 150 dpi, the amount of TYLCV and CLCuGB DNA in plants of T+B treatment is similar to the amount of TYLCV in plants of the T treatment. Interestingly CLCuGA DNA accumulation is significantly higher than that of the virus and CLCuGB at 150 dpi, irrespective of the treatment.

6. Vector transmission of TYLCV and satellites

As the DNA of CLCuGB and OLCBFA were shown to accumulate at higher levels than the DNA of TYLCV at 32 dpi (Fig. 3), it was thought that they may be readily transmitted by the vector *B. tabaci* from such plants. However as they also have a deleterious effect on TYLCV DNA accumulation at 32 dpi, they may have also a negative impact on the transmission efficiency of TYLCV. These assumptions were tested with two transmission experiments in which tomato plants were used as source at 32 dpi. In Experiment V1, three source plants agroinfected with TYLCV alone (T), three with TYLCV and CLCuGB (T+B) and three with TYLCV and OLCBFA (T+OA) were sampled at 32 dpi to assess virus and satellite DNA accumulation at the beginning of the acquisition access period (AAP). As in Experiment 1 (Fig. 3), both satellites had a deleterious effect on TYLCV DNA accumulation of (Fig. 8). As expected, the transmission efficiency of TYLCV was infected with TYLCV alone (21.9%). As in Experiment 1, both satellites accumulated at higher levels than TYLCV (Fig. 8). As expected, OLCBFA was readily transmitted with 75% of the TYLCV-infected test plants (8 plants) which tested positive for the OLCBFA (Suppl. Table 1). The transmission efficiency of CLCuGB was lower, with 50% of the TYLCV-infected test plants (6 plants) exhibiting the typical symptoms associated with CLCuGB.

In Experiment V2, the transmission efficiency of CLCuGB was tested again but with a different Med biotype (Q1 instead of Q2). As in the previous experiments, the CLCuGB exhibited a deleterious effect on TYLCV DNA accumulation and its accumulation was at a higher level than that of TYLCV (Fig. 8). As expected, the transmission efficiency of TYLCV was lower with plants coinfecting with CLCuGB (5.9%) than with plants infected with TYLCV alone (13.1%) and the difference was significant ($p\text{-value}=0.0342$) (Suppl. Table 1). CLCuGB was readily transmitted with 100% of the TYLCV-infected test plants (6 plants) exhibiting the typical symptoms associated with CLCuGB. Compared to experiment V1, this higher efficiency may be

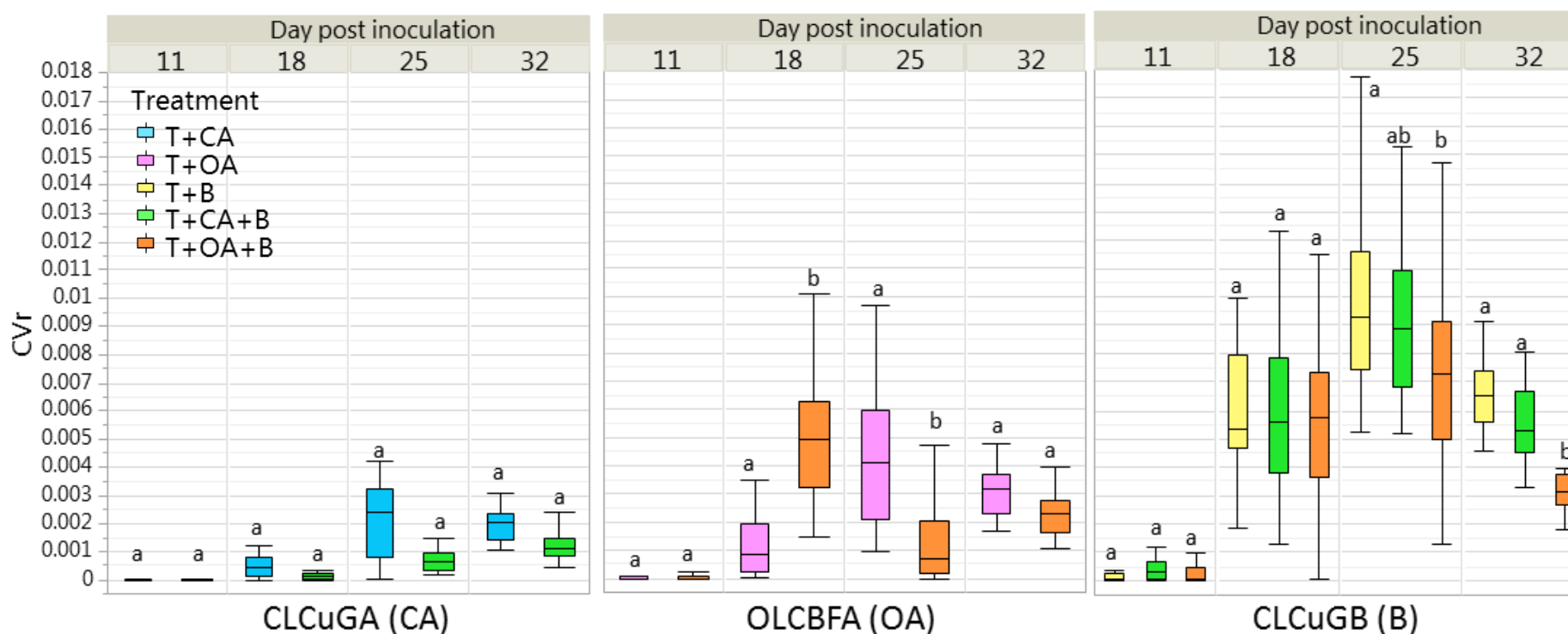


Figure 5: Accumulation of CLCuGA, CLCuGB and OLCBFA DNA at 11, 18, 25 and 32 days post inoculation in tomato plants infected with TYLCV and different combination of satellites.

Satellite DNA was quantified with real-time PCR on individual plant samples in different treatments: TYLCV+CLCuGB (T+B), TYLCV+CLCuGA (T+CA), TYLCV+OLCBFA (T+OA), TYLCV+OLCBFA+CLCuGB (T+OA+B) and TYLCV+CLCuGA+CLCuGB (T+CA+B). DNA accumulation and box plots are as in Figure 3. Boxplots with different letters indicate significant differences between samples at each date of sampling (Tukey's test, $p=0.05$).

due to the contrasted ratio of CLCuGB/ TYLCV DNA accumulation between the two experiments, 10 in Experiment V2 and only 1.5 in Experiment V1 (Fig. 8).

Unlike the DNA accumulation patterns assessed at 32 dpi where the amount of CLCuGB DNA was about 5 times higher than that of TYLCV DNA (Figs 3, 6, 7, 8) and where CLCuGB had a deleterious effect on viral DNA accumulation, at 150 dpi instead, the DNA amounts of CLCuGB and TYLCV irrespective of the treatment were all similar (Figs 6, 7). To test if these contrasted accumulation patterns may have an effect on transmission efficiencies of TYLCV and CLCuGB, 32 dpi and 150 dpi source plants were compared in Experiment V3. As in the previous experiments, the CLCuGB exhibited a deleterious effect on TYLCV DNA accumulation at 32 dpi and its accumulation was at a higher level than that of TYLCV (Fig. 8B). Unexpectedly however, the DNA accumulation pattern obtained with the 150 dpi plants was different from that obtained in Experiment 2 and 3. Indeed, instead of the similar DNA accumulations obtained previously, the three monitored DNA accumulations were significantly different with that of TYLCV alone being the highest, followed by that of TYLCV in coinfection, and the lowest being that of CLCuGB (Fig.8). CLCuGB was transmitted in 4 of the 13 (30%) TYLCV-infected plants at 150 dpi while it was transmitted in 64% of TYLCV infected plants at 32 dpi. This result is consistent with the DNA accumulation of CLCuGB in the 150 dpi source plants which is lower than that of the 32 dpi plants (Fig.8C); a similar difference of CLCuGB amount was detected in Experiments 2 and 3 (Figs 6 and 7). The transmission rate of TYLCV was significantly higher from TYLCV infected plants (19.9%) than from TYLCV+CLCuGB infected plants (10.5%; Fig.9C, Suppl. Tables 1C and 2). This result is consistent with the significant difference of TYLCV DNA accumulation between OT and OT+B source plants (Fig 9C). Unfortunately, contrasted transmission frequencies (10-45%) were recorded between the three 32 dpi source plants infected with TYLCV alone which compromised the reliability of the transmission efficiency assessment for this treatment (Suppl. Tables 1C). The apparent absence of deleterious effect of CLCuGB on TYLCV transmission efficiency as observed in Experiment V1 and V2 may be due to a technical problem in this treatment.

To summarize, OLCBFA and CLCuGB are readily transmitted from 32 dpi source plants (50-100% success) and the transmission efficiency of betasatellite tested with 150 dpi source plants was lower (30%). The transmission efficiency of TYLCV is consistently reduced when its DNA accumulation is reduced in source plants coinfecting with beta- or alpha-satellites.

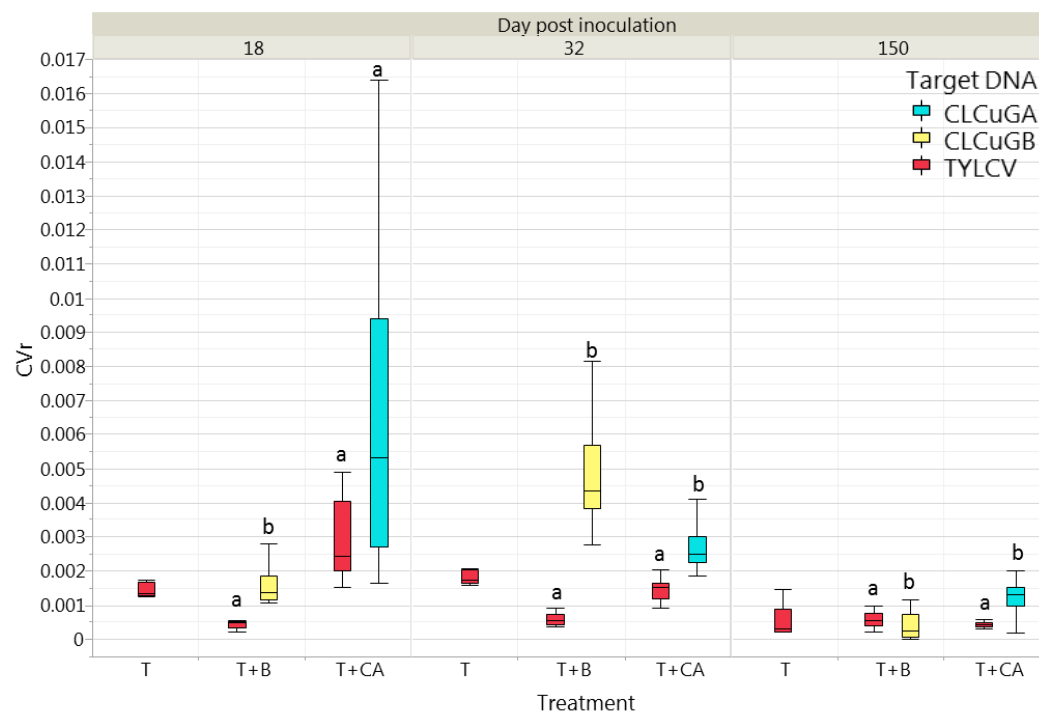


Fig. 6 : Accumulation of virus and satellite DNA at 18, 32 and 150 days post inoculation in tomato plants infected with TYLCV (T), TYLCV+CLCuGB (T+B), and TYLCV+CLCuGA (T+CA).

TYLCV and satellite DNA was quantified with real-time PCR on individual plant samples in the different treatments. DNA accumulation and box plots are as in Figure 3. Red boxes correspond to the TYLCV-Mld genome, blue boxes to the CLCuGA genome, and yellow boxes to the CLCuGB genome. Boxplots with different letters indicate significant differences between samples at each date of sampling (Tukey's test, $p=0.05$).

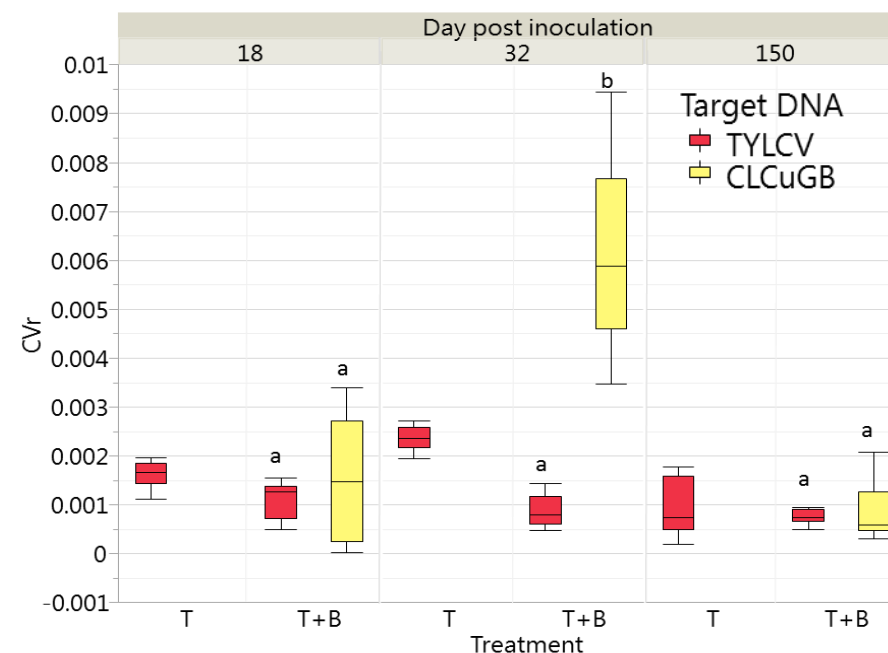


Fig. 7 : Accumulation of TYLCV and CLCuGB DNA at 18, 32 and 150 days post inoculation in tomato plants infected with TYLCV (T) or TYLCV+CLCuGB (T+B). TYLCV and CLCuGB DNA were quantified with real-time PCR on individual plant samples in different treatments. DNA accumulation and box plots are as in Figure 3. Red boxes correspond to the TYLCV-Mld genome, and yellow boxes to the CLCuGB genome. Boxplots with different letters indicate significant differences between samples at each date of sampling (Tukey's test, $p=0.05$).

DISCUSSION

For some begomoviruses like *Cotton leaf curl virus*, betasatellites were reported to be indispensable for a full symptomatic infection in their natural host species. For other begomoviruses which were reported at least once with a satellite (alpha or beta) in natural conditions, it is generally not known if the association is frequent or merely accidental. At least two complementary approaches may be used to address this question: (i) collecting and testing a larger number of virus infected plants to determine the frequency of plants co-infected with satellites, or (ii) identifying a feature that might be diagnostic of a sustained association between virus and satellites. In this paper we propose some original results which may help to find out such a feature. These results were generated by monitoring the dynamic of DNA accumulation of virus and satellites between 11 and 150 dpi and by assessing the transmission efficiency of virus-satellite associations compared to that of virus alone. Our approach is original because of the following reasons. Firstly, it is the first time that the accumulation dynamic of virus and satellites were monitored over such an extended period of infection (11-150 dpi); the measures reported in previous studies were generally limited to a single time point except in two reports where the accumulation dynamic was monitored between 6 and 65 dpi (Cui et al., 2004; Jyothsna et al., 2013). Secondly, it is the first time that an experiment was designed and used to compare virus DNA accumulation with satellite DNA accumulation; except a single report in which ToLCNDV and betasatellite DNA accumulations were measured by qPCR over time but were only compared within and not between targets (Jyothsna et al., 2013), the other reports contain estimations of viral and satellite DNA accumulations by Southern-blot without any explicit intention to compare them to each other. Thirdly, it is the first time that the dynamics of DNA accumulations were monitored simultaneously for alpha- and beta-satellites.

Although TYLCV-Mld was never reported with satellites in natural conditions, it has been shown to readily transreplicate AYVB with increased symptom severity (Ueda et al., 2012). Thus, TYLCV-Mld was considered as an appropriate candidate to examine this new approach, not only because satellite transreplication is possible, but also because a sustainable association of betasatellites with one of the most damaging tomato begomovirus would have dramatic agronomic consequences. We show here for the first time that TYLCV-Mld can support the replication and the systemic spread of CLCuGB, CLCuGA and OLCA in tomato plants, which showed that TYLCV-Mld can be a helper virus of large range satellites, including Asian and African ones. Moreover, as the monitoring of Experiments 2 and 3 were extended beyond the

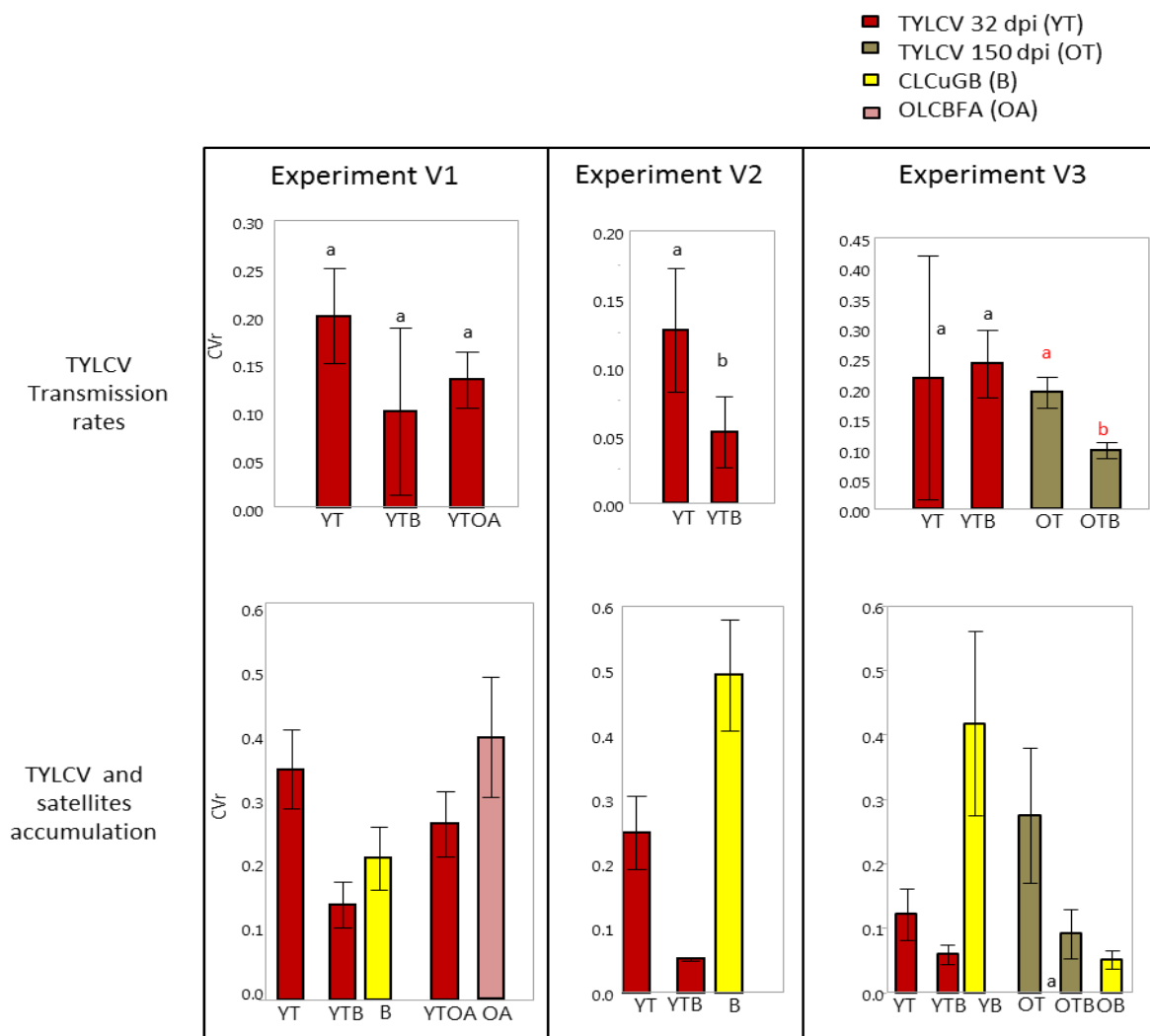


Fig. 8: TYLCV transmission rate and DNA accumulation of virus and satellite in source plants.

Transmission rates were estimated from three source plants per treatment. 20, 30 to 45, and 20 to 45 tomato test plants were used per source plant in experiment 1, 2 and 3 respectively. Treatments are coded as following: 32 dpi TYLCV-infected plants (YT), 150 dpi TYLCV-infected plants (OT), 32 dpi TYLCV+CLCuGB-infected plants (YTB), 150 dpi TYLCV+CLCuGB infected plants (OTB) and TYLCV+OLCBFA (YTOA). Error bars represent standard deviation between source plants. Histogram with different letters indicate significant differences between treatment (Fisher's exact test, $p=0.05$).

Accumulation of TYLCV, OLCBFA and CLCuGB DNA were estimated at 32 and 150 dpi in tomato plants infected with the different combination described above. DNA was quantified with real-time PCR on the three individual source plants of the different treatments in each transmission experiment. DNA accumulations are as in Figure 3. Red boxes correspond to the TYLCV-Mld genome in 32 dpi-infected plants; green boxes to the TYLCV-Mld genome in 150 dpi-infected plants, yellow boxes to the CLCuGB genome in treatments YTB and OTB and the pink box corresponds to the OLCBFA genome in treatments YTOA. Error bars represent standard deviation between source plants.

month period which was generally scrutinized in previous studies, we were able to show that the support provided by TYLCV-Mld is efficient because it lasts at least up to 5 months after infection. Indeed all the plants which were positive for the detection of CLCuGB or CLCuGA at 18 dpi remained positive at 150 dpi.

The diseased phenotypes of the tomato plants inoculated with the different satellite combinations were recorded. OLCBFA and CLCuGA did not modulate the height and the symptoms induced by TYLCV. Alphasatellites were reported to have no impact on virus symptoms (Briddon et al., 2004; Kon et al., 2009)} except in two instances where they attenuated them (Idris et al., 2011; Wu and Zhou, 2005). In contrast, plants coinfecting with TYLCV and betasatellite presented more severe leaf symptoms and were smaller than those infected with TYLCV alone. This is consistent with previous results which showed that the severity of symptoms was dramatically increased when TYLCV was experimentally coinfecting with betasatellite ((Ito et al., 2009; Kon and Gilbertson, 2012; Ueda et al., 2012; Zhang et al., 2009). This increase of the symptom severity was shown to be caused by protein betaC1, a pathogenicity determinant encoded by the betasatellite (Mansoor et al., 2006). The symptoms exhibited by betasatellite infected plants coinfecting with either of the two alphasatellite presented similar symptoms with plants infected only with CLCuGB and TYLCV. Similar observation was reported for numerous begomovirus/satellites complexes (Kon and Gilbertson, 2012; Kumar et al., 2015) although some alphasatellites were reported to attenuate the symptom induced by the betasatellite (Idris et al., 2011; Wu and Zhou, 2005).

DNA accumulation of TYLCV- Mld was consistently and significantly reduced when co-infected with CLCuGB. This result was observed in three independent experiments and also when plants were co-inoculated with TYLCV, CLCuGB and an alphasatellite. This is in contrast with the nil or positive impact of betasatellite on begomovirus accumulation which has been generally reported (Jyothsna et al., 2013; Kon and Gilbertson, 2012; Kumar et al., 2013; Li et al., 2005; Saunders et al., 2000; Tiwari et al., 2010). A decrease of the virus DNA accumulation was however suggested although not stated by the authors, from the Southern-blot analyses in tomato plants coinfecting with TYLCV and AYVB (Ueda et al., 2012), in *Nicotiana benthamiana* plants coinfecting with Eupotarium yellow vein virus and its cognate betasatellite (Saunders et al., 2008), and in tomato plants coinfecting with Tomato leaf curl Bangalore virus and Luffa leaf distortion betasatellite (Tiwari et al., 2010). Such a decrease of DNA accumulation observed for TYLCV-Mld could be explained by competition effects for access to the replication complex. The same

competition hypothesis has been proposed to explain the deleterious effect of RNA satellites on the accumulation of their helper virus (Roossinck et al., 1992). The fact that alphasatellites did not modulate the negative impact of CLCuGB is consistent with their replication autonomy.

The decrease of TYLCV DNA accumulation at 150 dpi in tomato plants infected with TYLCV is consistent with previous results showing that TYLCV genome decreased in frequency at the latest stage of infection when coinfecting with another begomovirus, suggesting that it was outcompeted in such situation (Garcia-Andres et al., 2007; Urbino et al., 2013). However it is the first time that decrease is shown from plants infected with TYLCV only which indicate that the decrease of DNA accumulation is not related to competition with another virus or satellite but is merely reflecting the normal virus cycle in tomato plants.

Comparing the dynamics of DNA accumulation of virus and satellites between 11 and 150 dpi is revealing some interesting features of virus-satellite interactions. The DNA accumulation of viral DNA was significantly higher than that of the satellites at the earliest collection time (11 dpi, Experiment 1) whereas at the latest collection time (32 dpi), the amount of satellite DNA was similar and for most of them, significantly higher, than that of the virus DNA. The low satellite accumulation at the earliest time point is consistent with the dependence status of satellites which can only replicate (betasatellite) and move (alpha and beta-satellites) after virus has replicated and produced the required proteins. Interestingly this initiation phase is very short and particularly for the betasatellite which only needs one more week, and possibly less, to accumulate at a significantly higher level than that of the helper virus. Unexpectedly, although alphasatellites are autonomous for their replication, their dynamic of accumulation is similar to that of TYLCV (Figure 3 and 6). This can be explained by their dependence on the virus coat protein for movement. CLCuGB, the replication-dependent satellite, accumulated at a higher level than both alphasatellites in tri-infected plants (Figure 6) suggesting that, in addition to its ability to be transreplicated by the virus, it is more efficient than alphasatellites to recruit the viral coat protein. Moreover, the comparison between the two alphasatellites revealed contrasted interactions with the virus and the betasatellite: (i) OLCBFA accumulated more efficiently than CLCuGA, irrespective of the satellite combinations, (ii) OLCBFA exhibited a significant deleterious effect on betasatellite and virus accumulations whereas CLCuGA had no detectable effect. The more efficient replication of OLCBFA may exert a higher need of common resources including the CP, which in turn has a negative impact on virus accumulation as previously reported (Kon and Gilbertson, 2012; Saunders et al., 2002; Wu and Zhou, 2005) and betasatellite accumulation. The

contrasted phenotypes of the alphasatellites is consistent with their high nucleotide divergence (49%) and amino acid divergence of their Rep (58%) in spite of their common origin; they were both isolated from okra plants collected during the same sampling in Burkina Faso (Tiendrébéogo et al., 2010). The hypothesis of contrasted replication efficiency may be tested in a leaf disk assay or in electroporated protoplasts.

As the ratio between the amounts of virus and satellite DNAs was changing over time, the relative accumulations determined before 32 dpi is apparently not relevant to predict the virus/satellite ratio of older plants. One of the major results obtained with the later sampling is that the deleterious effect of both beta- and alpha-satellite detected at 32 dpi may disappear in further samplings as shown in Experiments 2 and 3. Further tests are needed to test if the variations of the virus satellite ratios detected during the first month of infection reach a steady state later on, and if so, when it occurs.

CLCuGB and OLCBFA were shown here to have a negative impact on TYLCV DNA accumulation. The transmission efficiency monitored from TYLCV-infected plants with or without satellites showed that the transmission efficiency of TYLCV was positively correlated with the DNA accumulation. It is supposed that the decrease of DNA accumulation is itself correlated with a decrease of the transmissible form of the virus, most probably the virions. Very interestingly, whitefly transmission results of a DNA virus and its DNA satellites are very similar to aphid transmission results of the RNA virus *Cucumber mosaic virus* (genus *Cucumovirus*, family *Bromoviridae*) and its RNA satellites (Escriu et al., 2000). Like TYLCV-Mld, the transmissibility of CMV is correlated with viral accumulation, and its accumulation is affected by satellites RNAs. Necrogenic RNA satellites increased dramatically the virulence of CMV in tomato. Although the RNA satellites were never reported to provide any benefit to CMV and were considered as hyperparasites (Alonso-Prados et al., 1998), they have been responsible of tomato necrosis epidemics on tomato in France and Spain (Jordá et al., 1992; Marrou et al., 1973). The fitness components derived from the transmission tests of CMV with or without RNA satellites were introduced into deterministic models of virulence evolution, which predicted that the emergence of CMV genotypes supporting satRNAs necrogenic for tomato would emerge only under some conditions including high density aphid-vector populations (Escriu et al., 2003).

Thus, it cannot be excluded that TYLCV-Mld supporting betasatellites may also emerge under some environmental conditions including high density whitefly-vector populations which may compensate the deleterious effect of the satellites on the transmission efficiency of TYLCV. Such a scenario is realistic particularly in Asian and African agroecosystems which contain betasatellite-associated begomoviruses. Indeed, TYLCV-IL a sister strain of TYLCV-Mld has

been detected in association with an alphasatellite in Japan (Shahid et al., 2014). Moreover, a TYLCV strain from Oman (TYLCV-OM) has been shown to be associated with both a betasatellite (Tomato leaf curl betasatellite, ToLCB) and an unusual alphasatellite (Ageratum yellow vein Singapore alphasatellite, AYVSGA) (Idris et al., 2011) in tomato plants in Oman. The risk of emergence of a TYLCV-Mld/betasatellite association is presently very low in Western Mediterranean countries because betasatellites have never been reported. However the risk cannot be excluded because betasatellite-associated begomoviruses may be accidentally introduced and the recent introduction of Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) into Spain reminds us that it is possible. Fortunately, the isolate of ToLCNDV was apparently introduced without any of the satellites reported in association with it in India (Jyothsna et al., 2013).

REFERENCES

- Alonso-Prados, J.L., Aranda, M.A., Malpica, J.M., García-Arenal, F., Fraile, A., 1998. Satellite RNA of Cucumber Mosaic Cucumovirus Spreads Epidemically in Natural Populations of Its Helper Virus. *Phytopathology* 88, 520-524.
- Briddon, R.W., Bull, S.E., Amin, I., Mansoor, S., Bedford, I.D., Rishi, N., Siwatch, S.S., Zafar, Y., Abdel-Salam, A.M., Markham, P.G., 2004. Diversity of DNA 1: a satellite-like molecule associated with monopartite begomovirus–DNA β complexes. *Virology* 324, 462-474.
- Chen, L.-F., Rojas, M., Kon, T., Gamby, K., Xoconostle-Cazares, B., Gilbertson, R.L., 2009. A severe symptom phenotype in tomato in Mali is caused by a reassortant between a novel recombinant begomovirus (Tomato yellow leaf curl Mali virus) and a betasatellite. *Molecular Plant Pathology* 10, 415-430.
- Cui, X.F., Li, G.X., Wang, D.W., Hu, D.W., Zhou, X.P., 2005. A begomovirus DNA beta-encoded protein binds DNA, functions as a suppressor of RNA silencing, and targets the cell nucleus. *Journal of Virology* 79, 10764-10775.
- Cui, X.F., Tao, X.R., Xie, Y., Fauquet, C.M., Zhou, X.P., 2004. A DNA beta associated with Tomato Yellow Leaf Curl China Virus is required for symptom induction. *Journal of Virology* 78, 13966-13974.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B., 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Reporter* 1, 19-21.
- Dry, I.B., Rigden, J.E., Krake, L.R., Mullineaux, P.M., Rezaian, M.A., 1993. Nucleotide sequence and genome organization of tomato leaf curl geminivirus. *Journal of General Virology* 74, 147-151.
- Escriu, F., Fraile, A., GarciaArenal, F., 2003. The evolution of virulence in a plant virus. *Evolution* 57, 755-765.
- Escriu, F., Perry, K.L., GarciaArenal, F., 2000. Transmissibility of Cucumber mosaic virus by *Aphis gossypii* correlates with viral accumulation and is affected by the presence of its satellite RNA. *Phytopathology* 90, 1068-1072.
- Garcia-Andres, S., Tomas, D.M., Sanchez-Campos, S., Navas-Castillo, J., Moriones, E., 2007. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. *Virology* 365, 210-219.
- Haber, S., Ikegami, M., Bajet, N.B., Goodman, R.M., 1981. Evidence for a divided genome in bean gold mosaic virus, a geminivirus. *Nature* 289, 324-326.
- Idris, A.M., Shahid, M.S., Briddon, R.W., Khan, A.J., Zhu, J.K., Brown, J.K., 2011. An unusual alphasatellite associated with monopartite begomoviruses attenuates symptoms and reduces betasatellite accumulation. *Journal of General Virology* 92, 706-717.
- Ito, T., Kimbara, J., Sharma, P., Ikegami, M., 2009. Interaction of tomato yellow leaf curl virus with diverse betasatellites enhances symptom severity. *Archives of Virology* 154, 1233-1239.
- Jordá, C., Alfaro, A., Aranda, M.A., Moriones, E., García-Arenal, F., 1992. Epidemic of cucumber mosaic virus plus satellite RNA in tomatoes in eastern Spain. *Plant Dis.* 76, 363-366.
- Jyothisna, P., Haq, Q.M.I., Singh, P., Sumiya, K.V., Praveen, S., Rawat, R., Briddon, R., Malathi, V.G., 2013. Infection of tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV), a bipartite

- begomovirus with betasatellites, results in enhanced level of helper virus components and antagonistic interaction between DNA B and betasatellites. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 5457-5471.
- Khan, A.J., Akhtar, S., Singh, A.K., Al-Shehi, A.A., Al-Matrushi, A.M., Ammara, U., Briddon, R.W., 2014. Recent evolution of a novel begomovirus causing tomato leaf curl disease in the Al-Batinah region of Oman. *Archives of Virology* 159, 445-455.
- Khan, A.J., Idris, A.M., Al-Saady, N.A., Al-Mahraki, M.S., Al-Subhi, A.M., Brown, J.K., 2008. A divergent isolate of tomato yellow leaf curl virus from Oman with an associated DNA beta satellite: an evolutionary link between Asian and the Middle Eastern virus-satellite complexes. *Virus Genes* 36, 169-176.
- Kheyr-Pour, A., Bendahmane, M., Matzeit, V., Accotto, G.P., Crespi, S., Gronenborn, B., 1991. Tomato yellow leaf curl virus from Sardinia is a whitefly-transmitted monopartite geminivirus. *Nucleic Acids Research* 19, 6763-6769.
- Kon, T., Gilbertson, R.L., 2012. Two genetically related begomoviruses causing tomato leaf curl disease in Togo and Nigeria differ in virulence and host range but do not require a betasatellite for induction of disease symptoms. *Archives of Virology* 157, 107-120.
- Kon, T., Rojas, M.R., Abdourhamane, I.K., Gilbertson, R.L., 2009. Roles and interactions of begomoviruses and satellite DNAs associated with okra leaf curl disease in Mali, West Africa. *Journal of General Virology* 90, 1001-1013.
- Kumar, J., Gunapati, S., Alok, A., Lalit, A., Gadre, R., Sharma, N., Roy, J., Singh, S., 2015. Cotton leaf curl Burewala virus with intact or mutant transcriptional activator proteins: complexity of cotton leaf curl disease. *Archives of Virology* 160, 1219-1228.
- Kumar, J., Gunapati, S., Singh, S., Kumar, A., Lalit, A., Sharma, N., Puranik, R., Tuli, R., 2013. A new betasatellite associated with cotton leaf curl Burewala virus infecting tomato in India: influence on symptoms and viral accumulation. *Archives of Virology* 158, 1349-1353.
- Kumar, J., Kumar, J., Singh, S.P., Tuli, R., 2014. Association of satellites with a mastrevirus in natural infection: complexity of Wheat dwarf India virus disease. *Journal of Virology* 88, 7093-7104.
- Li, Z.H., Xie, Y., Zhou, X.P., 2005. Tobacco curly shoot virus DNAP is not necessary for infection but intensifies symptoms in a host-dependent manner. *Phytopathology* 95, 902-908.
- Mansoor, S., Khan, S.H., Bashir, A., Saeed, M., Zafar, Y., Malik, K.A., Briddon, R., Stanley, J., Markham, P.G., 1999. Identification of a Novel Circular Single-Stranded DNA Associated with Cotton Leaf Curl Disease in Pakistan. *Virology* 259, 190-199.
- Mansoor, S., Zafar, Y., Briddon, R.W., 2006. Geminivirus disease complexes: the threat is spreading. *Trends in Plant Science* 11, 209-212.
- Marrou, J., Duteil, M., Lot, H., Clerjeau, M., 1973. La nécrose de la tomate: Une grave virose des tomates cultivées en plein champ. *Horticulture Maraichère* 137, 37-41.
- Navot, N., Pichersky, E., Zeidan, M., Zamir, D., Czosnek, H., 1991. Tomato yellow leaf curl virus: A whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. *Virology* 185, 151-161.
- Nawaz-ul-Rehman, M.S., Nahid, N., Mansoor, S., Briddon, R.W., Fauquet, C.M., 2010. Post-transcriptional gene silencing suppressor activity of two non-pathogenic alphasatellites associated with a begomovirus. *Virology* 405, 300-308.

- Patil, B.L., Fauquet, C.M., 2010. Differential interaction between cassava mosaic geminiviruses and geminivirus satellites. *Journal of General Virology* 91, 1871-1882.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29.
- R_Development_Core_Team, 2010. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Roossinck, M.J., Sleat, D., Palukaitis, P., 1992. Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. *Microbiol Rev* 56, 265-279.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J.B., Moorman, A.F.M., 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research* 37.
- Saeed, M., Zafar, Y., Randles, J.W., Rezaian, M.A., 2007. A monopartite begomovirus-associated DNA beta satellite substitutes for the DNA B of a bipartite begomovirus to permit systemic infection. *Journal of General Virology* 88, 2881-2889.
- Saunders, K., Bedford, I.D., Briddon, R.W., Markham, P.G., Wong, S.M., Stanley, J., 2000. A unique virus complex causes Ageratum yellow vein disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 6890-6895.
- Saunders, K., Bedford, I.D., Stanley, J., 2002. Adaptation from whitefly to leafhopper transmission of an autonomously replicating nanovirus-like DNA component associated with ageratum yellow vein disease. *Journal of General Virology* 83, 907-913.
- Saunders, K., Briddon, R.W., Stanley, J., 2008. Replication promiscuity of DNA-beta satellites associated with monopartite begomoviruses; deletion mutagenesis of the Ageratum yellow vein virus DNA-beta satellite localizes sequences involved in replication. *Journal of General Virology* 89, 3165-3172.
- Saunders, K., Norman, A., Gucciardo, S., Stanley, J., 2004. The DNA β satellite component associated with ageratum yellow vein disease encodes an essential pathogenicity protein (β C1). *Virology* 324, 37-47.
- Saunders, K., Stanley, J., 1999. A Nanovirus-like DNA Component Associated with Yellow Vein Disease of Ageratum conyzoides: Evidence for Interfamilial Recombination between Plant DNA Viruses. *Virology* 264, 142-152.
- Shahid, M.S., Ikegami, M., Waheed, A., Briddon, R.W., Natsuaki, K.T., 2014. Association of an Alphasatellite with Tomato Yellow Leaf Curl Virus and Ageratum Yellow Vein Virus in Japan Is Suggestive of a Recent Introduction. *Viruses* 6, 189-200.
- Tiendrébéogo, F., Lefeuvre, P., Hoareau, M., Villemot, J., Konaté, G., Traoré, A.S., Barro, N., Traoré, V.S., Reynaud, B., Traoré, O., 2010. Molecular diversity of Cotton leaf curl Gezira virus isolates and their satellite DNAs associated with okra leaf curl disease in Burkina Faso. *Virol J* 7, 48.
- Tiwari, N., Padmalatha, K.V., Singh, V.B., Haq, Q.M.I., Malathi, V.G., 2010. Tomato leaf curl Bangalore virus (ToLCBV): infectivity and enhanced pathogenicity with diverse betasatellites. *Archives of Virology* 155, 1343-1347.
- Ueda, S., Onuki, M., Yamashita, M., Yamato, Y., 2012. Pathogenicity and insect transmission of a begomovirus complex between tomato yellow leaf curl virus and Ageratum yellow vein betasatellite. *Virus Genes* 44, 338-344.

- Urbino, C., Gutierrez, S., Antolik, A., Bouazza, N., Doumayrou, J., Granier, M., Martin, D.P., Peterschmitt, M., 2013. Within-Host Dynamics of the Emergence of Tomato Yellow Leaf Curl Virus Recombinants. *Plos One* 8.
- Wu, P.J., Zhou, X.P., 2005. Interaction between a nanovirus-like component and the Tobacco curly shoot virus/satellite complex. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 37, 25-31.
- Xie, Y., Wu, P., Liu, P., Gong, H., Zhou, X., 2010. Characterization of alphasatellites associated with monopartite begomovirus/betasatellite complexes in Yunnan, China. *Virology Journal* 7, 178-178.
- Zhang, H., Gong, H., Zhou, X., 2009. Molecular characterization and pathogenicity of tomato yellow leaf curl virus in China. *Virus Genes* 39, 249-255.
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., Vitzthum, F., 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* 32.

Supplementary Table 1 Transmission rates of TYLCV and satellites.Experiment V1

Treatment	Source plant	Number of test plant	Number of TYLCV positive	Number of satellite positive	TYLCV transmission rate	Satellite transmission rate
YT	1	20	4		0.2	
YT	2	20	5		0.25	
YT	3	20	3		0.15	
YT+OA	1	20	2	1	0.1	0.5
YT+OA	2	20	3	2	0.15	0.75
YT+OA	3	20	3	3	0.15	1
YT+B	1	20	1	0	0.05	0
YT+B	2	20	4	2	0.2	0.5
YT+B	3	20	1	1	0.05	1

Experiment V2

Treatment	Source plant	Number of test plant	Number of TYLCV positive	Number of CLCuGB positive	TYLCV transmission rate	Satellite transmission rate
YT	1	45	8		0.178	
YT	2	45	5		0.111	
YT	3	44	4		0.091	
YT+B	1	45	3	3	0.067	1
YT+B	2	45	1	1	0.022	1
YT+B	3	30	2	2	0.067	1

Experiment V3

Treatment	Source plant	Number of test plant	Number of TYLCV positive	Number of CLCuGB positive	TYLCV transmission rate	Satellite transmission rate
YT	1	20	2		0.100	
YT	2	20	9		0.450	
YT	3	20	2		0.100	
OT	1	45	8		0.178	
OT	2	45	10		0.222	
OT	3	45	8		0.178	
YTB	1	45	11	8	0.244	0.727
YTB	2	44	13	6	0.295	0.462
YTB	3	22	4	4	0.182	1.000
OTB	1	45	4	0	0.089	0.000
OTB	2	44	4	1	0.091	0.250
OTB	3	45	5	3	0.111	0.600

Transmission rates were estimated from three source plants per treatment in experiment 1, 2 and 3 respectively. Treatments are coded as following:

YT: 32 dpi TYLCV-infected plants

OT : 150 dpi TYLCV-infected plants

YTB: 32 dpi TYLCV+CLCuGB-infected plants

OTB: 150 dpi TYLCV+CLCuGB infected plants

YTOA: TYLCV+OLCBFA

Error bars represent standard deviation between source plants. Histogram with different letters indicate significant differences between treatment (Fisher's exact test, $p=0.05$).

Supplementary Table 2 : Mean transmission rates of TYLCV , CLCuGB and OLCBFA

	Treatment	Mean transmission rate	Confidence interval
Exp 1			
	YT	21.9%	[12.7%-33.4%]
	YT+B	10.5%	[4.1%-20.1%]
	YT+OA	15.4%	[7.8%-25.9%]
Exp 2			
	YT	13.1%	[8%-19.5%]
	YT+B	5.9%	[2.4%-11.1%]
Exp 3			
	YT	19.8%	[10.3%-31.8%]
	YT+B	24.6%	[16.6%-33.6%]
	OT	19.9%	[13.8%-27%]
	OT+B	10.5%	[6.1%-16.4%]

Transmission rates were estimated from three source plants per treatment in experiment 1, 2 and 3 respectively. Treatments are coded as following:

YT: 32 dpi TYLCV-infected plants

OT : 150 dpi TYLCV-infected plants

YTB: 32 dpi TYLCV+CLCuGB-infected plants

OTB: 150 dpi TYLCV+CLCuGB infected plants

YTOA: TYLCV+OLCBFA

Error bars represent standard deviation between source plants. Histogram with different letters indicate significant differences between treatment (Fisher's exact test, $p=0.05$).

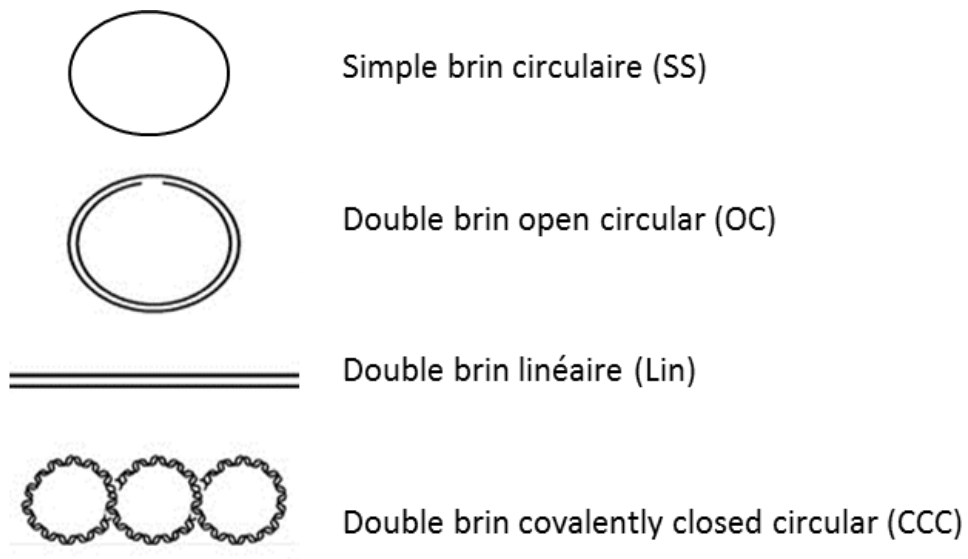


Figure 7: Les différentes conformations de l'ADN viral classiquement observées par Southern blotting.

4. Analyse qualitative des formes d'ADN viral et de satellites accumulées au cours de l'infection

Les résultats présentés dans le paragraphe précédent sous forme d'un article scientifique concernent l'estimation des ADNs viraux et satellites par une approche de PCR quantitative. Cette approche a l'avantage de présenter un seuil de sensibilité très bas, permettant leurs détections à des temps très précoces de l'infection. Elle a aussi l'avantage de pouvoir distinguer de façon quantitative de petites différences d'accumulation entre les partenaires de l'infection au sein d'une plante mais aussi entre plante grâce à une calibration à l'aide d'un gène de plante. En revanche, cette technique ne fait aucune distinction entre les diverses formes d'ADN viral ou satellites qui sont générés au cours d'une infection et qui sont notamment révélés lors de purification de virions du TYLCV ([Annexe 5](#)). Dans l'estimation quantitative de l'ADN viral par PCR, ces formes sont indifférenciées et additionnées.

Chez les géminivirus, l'ADN génomique se présente sous deux formes caractéristiques visualisées par Southern blot ; l'ADN simple brin circulaire (ADNsbc) qui est la forme encapsidée, et l'ADN double brin circulaire (ADNdbc) constituant la matrice de la réplication par cercle roulant (RCR) et qui forme des minichromosomes dans le noyau de cellules infectées (Abouzid et al., 1988). Grâce à des analyses plus fines et notamment des électrophorèses bidirectionnelles, et de la microscopie électronique, de nombreuses autres formes ont pu être mises en évidence. Leur identification a permis de distinguer des intermédiaires d'un deuxième mécanisme de réplication faisant intervenir de la recombinaison (RDR, Jeske et al., 2001). L'une de ces formes appelée « heterogeneous high-molecular-weight DNA » (hDNA) est détectable par Southern blot à partir d'une électrophorèse mono directionnelle.

L'ADNdbc peut se retrouver sous sa forme native, (circulaire super enroulé, SC), ou sous la forme circulaire relâchée (OC) et linéaire (Lin), formes qui sont possiblement enrichies au cours des étapes de l'extraction d'ADN du fait de cassures qu'elle pourrait générer ([Figure 6](#) et [Figure 7](#)). Ces différentes formes migrent généralement à des vitesses différentes dans une électrophorèse en gel d'agarose. Etant donné que les satellites sont aussi des molécules d'ADN simples brins circulaires qui sont supposées se répliquer par les mêmes mécanismes que ceux du virus assistant, on s'attend à retrouver les mêmes formes que celles observées pour les ADN viraux. La comparaison de Southern blot montrant l'analyse de génomes de géminivirus dans la littérature, révèlent des différences de profils génomiques qui suggèrent que la technique d'extraction pourrait avoir un effet sur la qualité et la migration de ces différentes formes (Mason et al., 2008). Nous avons dans un premier temps testé différentes techniques d'extraction d'ADN et identifié les différentes formes virales par digestion enzymatique avant de réaliser l'analyse qualitative et quantitative des ADN accumulés au cours de l'infection du TYLCV en présence de différents satellites.

4.1. Matériel et méthode

4.1.1.Extraction des ADN totaux de plante

Quatre variantes du protocole d'extraction classique utilisé au laboratoire (Dellaporta modifié) ont été testées. Les variations portent sur la composition du tampon d'extraction :

- qui comporte ou non du Sodium dodécyl sulphate (SDS), un détergent puissant qui solubilise les membranes cellulaires
- qui comporte ou non du chloroforme, qui solubilise un certain nombre de molécules protéiniques et lipidiques, et purifié la phase aqueuse (Tableau 7).

4.1.2.Identification des forme génomiques par digestion enzymatique

Enzymes de restrictions

Contrairement aux ADN simple brins, les ADN double brins, peuvent être digérés avec des enzymes de restriction. Les ADNs du TYLCV et du satellite OLCA ont été digérés par BamHI et les ADNs des satellites CLCuGA et CLCuGB par PstI; ces enzymes de restriction coupent les génomes 1 fois ce qui permet de les linéariser. Le mélange réactionnel est composé du tampon 1X spécifique à l'enzyme, de la BSA à 0,1 µg/µL, de l'enzyme à raison de 10 U/µg d'ADN et de 14 µl d'ADN total de plantes. Le mélange est mis à incuber à 37°C pendant 2 à 3h.

Nucléase S1

La nucléase S1 à faible concentration digère principalement les formes simples brins de l'ADN. Les ADN (17 µl d'ADN total) ont été traités dans un mélange réactionnel contenant le tampon 1X spécifique à l'enzyme et 10 U/µg d'ADN d'enzyme. Le mélange est mis à incuber à 37°C pendant 4 minutes. La réaction est stoppée avec 2µl d'EDTA à 0.5M.

4.1.3.Southern blot

Transfert de l'ADN sur membrane de nylon

Après migration des ADN sur gel d'agarose à 1%, une dénaturation alcaline du gel est faite par 2 incubations successives de 30 min dans une solution de NaOH à 0,2 M et de NaCl à 0,6 M. Puis le gel est incubé pendant 15 min dans un bain de tampon de transfert contenant du NaCl 0,6 M et du Tris 0,5 M à pH 7,5. Le transfert est effectué par capillarité sur une membrane de nylon Hybond-N+ (Amersham) pendant une nuit selon le protocole de transfert standard détaillé dans l'Annexe 2 soit durant 1h selon le protocole du System TurboBlotter™. Pour finir l'ADN est fixé sur la membrane de façon covalente par exposition aux UV (70,000µJ/cm²). Les membranes sont conservées à température ambiante jusqu'à leur hybridation.

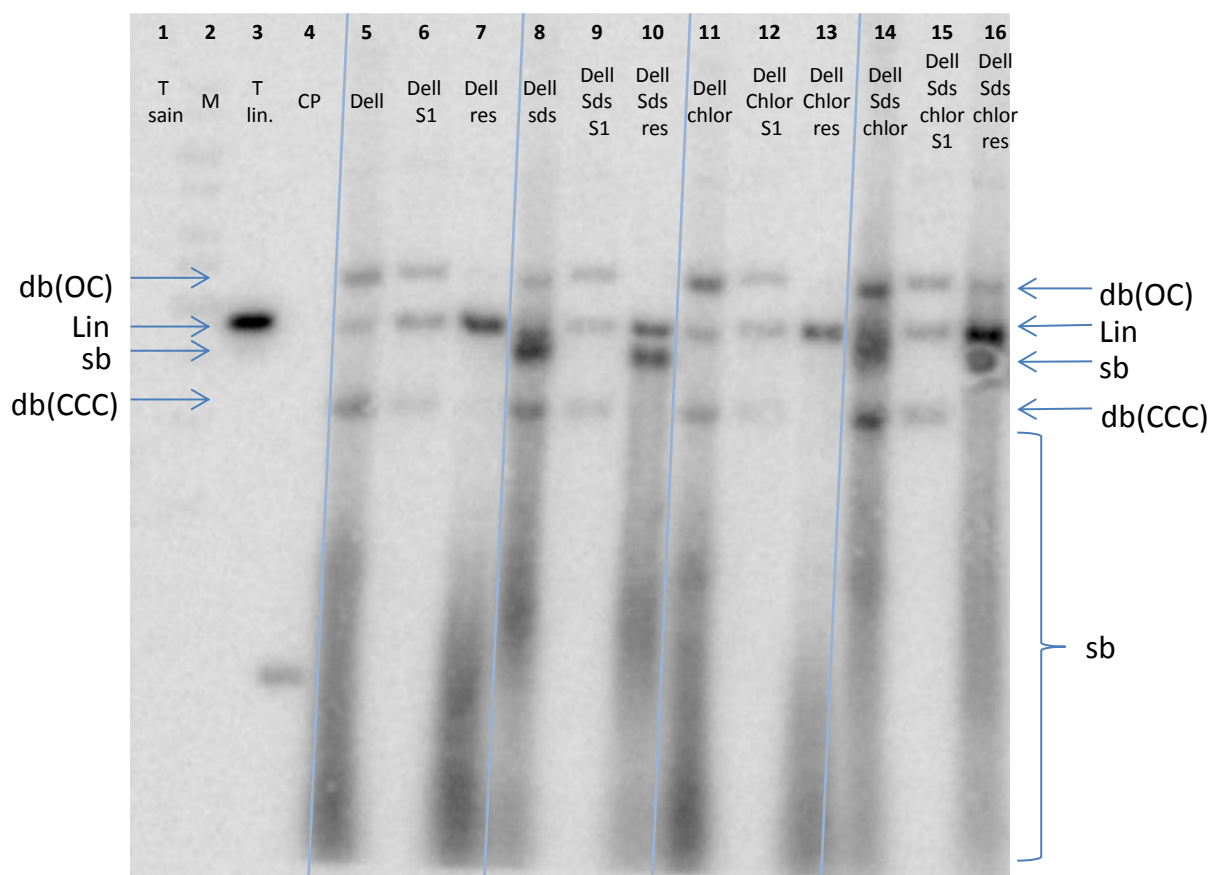


Figure 8: Identification des profils migration des différentes formes d'ADN du TYLCV par Southern blot.
CP : Dépôts d'une amplification PCR du gène de la CP.

Tableau 8: Amorces et conditions de PCR pour la mise en évidence des défauts

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Tm	Condition de PCR
CLCuGA-21-FW	5'-CCTAGTATCCCTTGTGCGAT-3'	54	95 °C pendant 5 min 30 cycles de 1 min à 94°C 1 min au Tm et 1min 30s à 72°C. 10 min à 72°C
CLCuGA-1336-rev	5'-TTTAGTCCCTCCGTGTTTCTAC-3'		
Beta01	5'-GGTACCACTACGCTACGCAGCAGCC-3'	54	
Beta02	5'-GGTACCTACCCTCCCAGGGGTACAC-3'		
IR_F	5'-TCAATATATAGTGAGTACCAAATGGCA-3'	60	
TYLCV-mld-2676-rev	5'-CCGATACACCAGGGATAAGTG-3'		

Hybridation moléculaire (marquage radioactif)

La préparation de la sonde se fait avec le kit Prime-a-gene® (Promega) par amorçage aléatoire (Random Priming) dans un mélange réactionnel contenant 25ng d'ADN de TYLCV ou de satellites préalablement excisé du plasmide et dénaturé par choc thermique (5 minutes à 95°C puis instantanément plongé dans la glace), du tampon labelling 1X, de la BSA à 400µg/ml, un mix de dATP, dTTP, dGTP à 20µM chacun, d'ADN Polymérase (Klenow) à 100 U/ml et en présence de [α 32P] dCTP à 333nM. Ce mélange est laissé en incubation 1h à température ambiante puis dénaturé pendant 5 min à 100°C et stocké dans la glace avant utilisation. Lors de l'hybridation, les membranes sont incubées pendant 4 h dans une solution de préhybridation (4X SSC, 2.5X Denhardt's [Ficoll 0,1% p/v, Polyvinyle pyrrolidone 0,1% p/v, BSA 0,1% p/v], SDS 1% v/v, ADN de sperme de saumon dénaturé 10 µg/mL, Tris 1M, pH8 et de l'EDTA 1mM). L'hybridation est effectuée toute une nuit à 65°C dans la solution d'hybridation (solution de préhybridation additionnée de Dextran sulfate 10 %) dans laquelle on ajoute la sonde. Deux lavages de 10 min avec une solution de SSC 1X + SDS 0.1 %, suivis de 2 lavages de 20 min avec une solution de SSC 0.5X + SDS 0.1 % sont effectués à 65°C. La lecture du marquage se fait avec un phosphoimageur et les images sont ensuite analysées avec le logiciel ImageQuant TL (GE Healthcare®). La spécificité de chaque sonde pour sa cible a été vérifiée par Southern blot.

Etant donné que les quatre génomes que nous avons ciblés par Southern blot présentent des pourcentages d'identité extrêmement faibles, le risque de réactions croisées a été considéré comme faible. Nous avons cependant confirmé cette supposition en montrant qu'une sonde préparée contre le génome betasatellite n'a pas détecté le génome du TYLCV, ni le génome de l'OLCBFA. De même, nous avons montré qu'une sonde préparée contre le génome de l'OLCBFA n'a pas détecté le génome du betasatellite. Le risque de réactions aspécifiques entre alphasatellites n'a pas été testé, car ils n'ont jamais été co-inoculés ensemble.

4.1.4.PCR du génome total du TYLCV et des satellites

Les génomes entiers du TYLCV et des satellites CLCuGB, CLCuGA ont été amplifiés par PCR à partir de plantes échantillonnées entre 32 et 150 jours après inoculation (dpi). Les amorces sont présentées dans le [Tableau 8](#). Les amorces utilisées pour l'amplification du CLCuGB sont les amorces beta 01-02 précédemment décrites (Bridson et al., 2002).

4.2. Résultats

4.2.1.Choix de la méthode d'extraction des ADN

Les ADN totaux de tomates infectées par le TYLCV ont été extraits selon 4 protocoles. Les profils de migration des ADN viraux natifs, digéré par BamH1, ou avec la nucléase S1 ont été comparés après hybridation avec des sondes préparées par amorçage aléatoire sur le génome entier du TYLCV ([Figure 8](#)). Les profils obtenus avec les deux tampons d'extraction

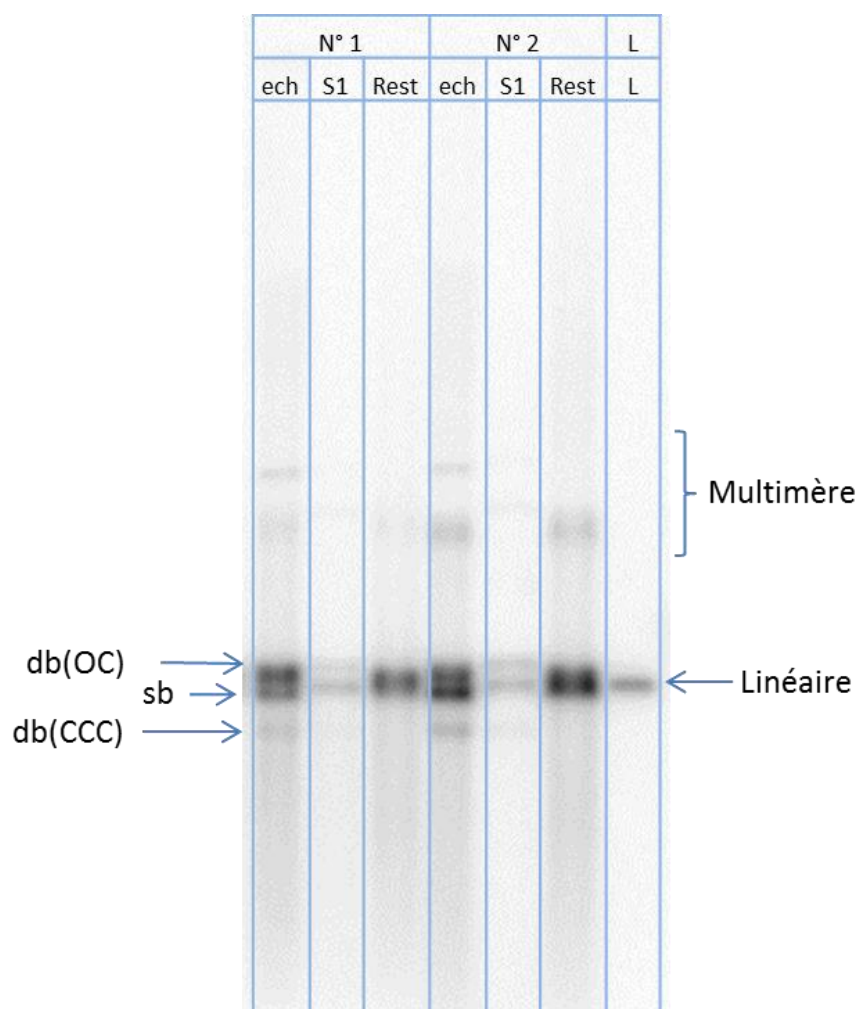


Figure 9: Identification des profils de migration des différentes formes d'ADN de deux échantillons (N°1 et N°2) de CLCuGB par Southern blot. Ech : dépôt de l'échantillon brut, S1 : dépôt de l'échantillon traité à la nucléase S1 (coupe les simples brins), Rest : dépôt de l'échantillon traité avec une enzyme de restriction qui coupe les doubles brins.

contenant du SDS (avec ou sans chloroforme) montrent quatre bandes d'ADN et un smear (puits 8 et 14), alors que les deux autres ne présentent que 3 bandes (puits 5 et 11). La bande manquante et le smear correspondent aux formes simples brins, car ils disparaissent après traitement par la nucléase S1 (puits 9 et 15). La digestion par BamHI fait disparaître 2 bandes que nous identifions comme étant les formes double brin circulaires SC et OC. Ces ADN ayant été linéarisés, ils disparaissent dans les puits 7 et 13 et on voit se renforcer après digestion dans les traitements incluant du SDS, une bande qui correspond à la forme Lin qui migre légèrement au-dessus des ADN simples brins circulaires (puits 10 et 16).

Les profils les plus complets sont ceux qui incluent le SDS. L'utilisation du chloroforme est contraignante et ne semble pas donner des extraits de meilleure qualité que ceux obtenus sans chloroforme. C'est la raison pour laquelle, compte tenu du nombre d'échantillons que nous avons à extraire nous avons choisi pour la suite de notre étude d'utiliser la technique Dellaporta additionnée de SDS, en nous passant de l'étape chloroforme, une étape délicate et relativement chronophage.

Nous avons également identifié avec les mêmes outils, les bandes correspondant aux différentes conformations de l'ADN du CLCuGB. Les profils de migration ont été analysés pour des extraits d'ADN obtenus à partir de plants de tomates infectées par TYLCV+CLCuGB (Figure 9). En plus des formes habituelles détectées (OC, sb, CCC et lin) on détecte des ADNs de poids moléculaires plus élevés qui peuvent correspondre à des formes multimériques du génome de satellite ou éventuellement à une forme hDNA caractéristique du mécanisme de réplication RDR décrit par le laboratoire de Holger Jeske (Jeske et al., 2001).

4.2.2. Impact des satellites sur les formes virales du TYLCV entre 18 et 150 dpi

Les profils de migration du TYLCV ont été comparés entre des plantes des différents traitements : TYLCV (T), TYLCV+CLCuGA (T+CA), TYLCV+OLCBFA (T+OA), TYLCV+CLCuGB (T+b), TYLCV+OBFA+CLCuGB (T+OA+b), TYLCV+CLCuGA+CLCuGB (T+CA+b) à 18, 25 et 32 dpi. Huit échantillons préalablement utilisés pour les analyses qPCR ont été analysés par Southern blot.

Les profils de migration des ADN viraux sont similaires entre les différents traitements mais des différences d'intensité apparaissent entre les échantillons (Figure 10). Les profils de migration d'ADN montrent seulement 2 bandes au lieu des 4 obtenues lors des tests préliminaires (Figure 8). Par comparaison avec les Southern-blots précédents, on suppose que ces deux bandes visibles correspondent au sb et dbOC. La bande CCC n'est pas visible sur ces gels probablement parce qu'elle aurait été abimée suite aux étapes de congélation-décongelations subies par les échantillons utilisés parallèlement pour les analyses de qPCR. Nous supposons que les formes CCC se seraient dégradées et sortiraient sous la forme OC.

La même analyse a été effectuée sur deux échantillons de chacun des traitements T, T+CA, T+b, à des temps plus tardifs (entre 32 et 150 dpi) (Figure 11). On voit nettement apparaître à

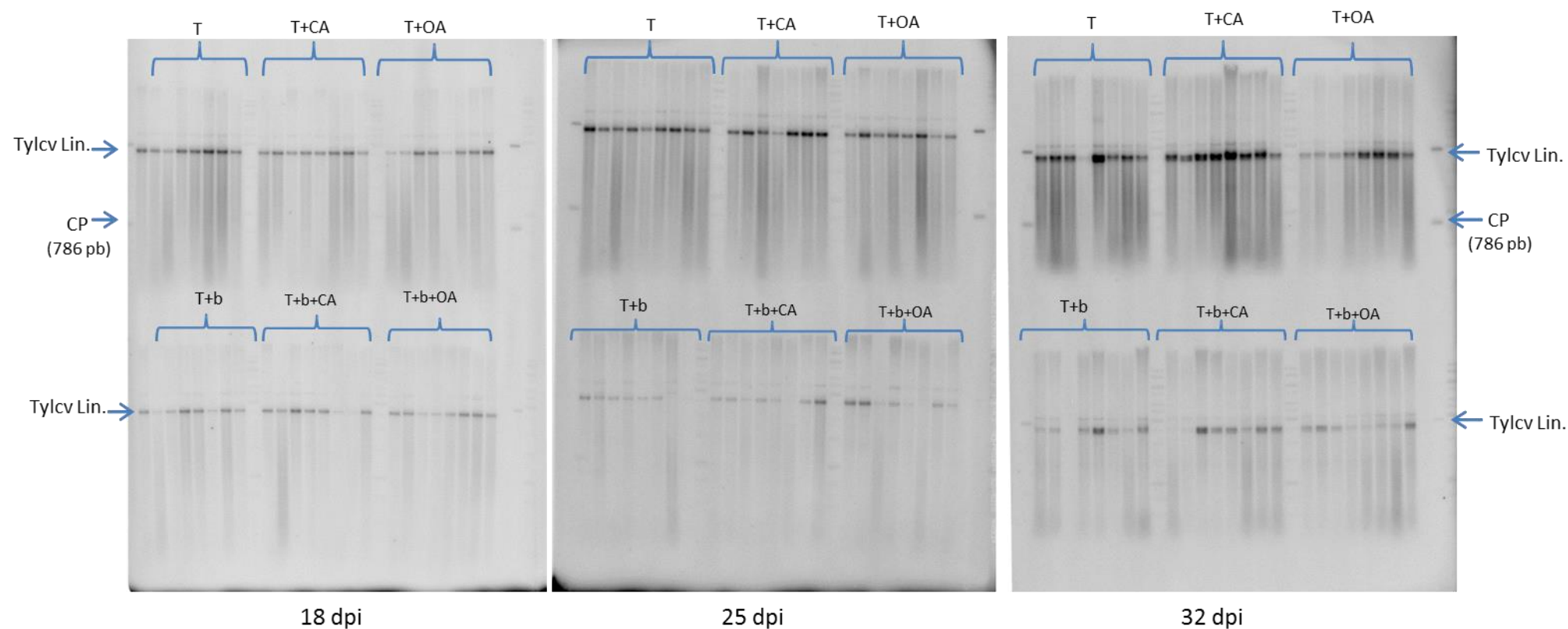


Figure 10 : Analyse par Southern blot des ADNs du TYLCV extraits de tomates infectées par différentes combinaisons TYLCV+satellites à 18, 25 et 32 jours après inoculation (dpi). TYLCV (T), TYLCV+CLCuGA (T+CA), TYLCV+OLCBFA (T+OA), TYLCV+CLCuGB (T+b), TYLCV+OLCBFA+CLCuGB (T+OA+b), TYLCV+CLCuGA+CLCuGB (T+CA+b).

90 dpi et 150 dpi des formes génomiques qui migrent plus loin que celles détectées à 32 dpi et nous supposons qu'il s'agit de formes défectives des ADN viraux. Curieusement, de telles formes ne sont pas détectées dans le traitement T+b alors qu'elles le sont dans le traitement T+CA.

Il semble donc que la présence de satellites ne modifie pas la nature des formes virales les plus abondantes entre 18 et 32 dpi. Cependant les formes subgénomiques du TYLCV détectés à 90 dpi en l'absence de satellite, sont apparemment moins abondantes voir absente en présence du betasatellite CLCuGB. Elles sont détectables en présence de l'alphasatellite CLCuGA avec des tailles plus hétérogènes (Figure 11). Ces profils devront être confirmés sur un nombre plus important de plantes.

4.2.3. Analyse des profils de migration des satellites entre 18 et 150 dpi.

Les mêmes huit échantillons analysés précédemment avec une sonde TYLCV pour l'étude des formes virales ont été analysés avec des sondes satellites (Figure 12). On observe le profil caractéristique identifié précédemment pour le CLCuGB avec deux bandes majoritaires, la db OC et la sb qui migre comme le linéaire, ainsi qu'une bande minoritaire, le db CCC (Figure 9)

En ce qui concerne le CLCuGB, on n'observe aucune différence de profils d'ADNs selon que le satellite était seul (T+b), ou en co-infection avec un alphasatellite (T+OA+b, T+CA+b) (Figure 12). Il est intéressant de noter que des ADNs de poids moléculaire plus élevés que les formes majoritaires db OC et sb sont détectables pour tous les échantillons. Ces ADNs pourraient correspondre soit à des multimères, soit à des molécules recombinantes ayant intégrés des fragments du satellite ou encore à une forme de type hDNA qui serait dans ce cas un argument en faveur d'une exploitation de la RDR par le satellite. On note que la 8ème plante du traitement T+CA+b présente un profil atypique qui comporte non seulement les deux bandes sb/dbCCC habituelles mais également un duo de bande qui migre plus lentement. Ces bandes hautes sont majoritaires à 18 dpi, puis commencent à disparaître à 25 et 32 dpi au profit du sb et du dbCCC de taille habituelle (Figure 12). Comme le satellite CLCuGB, le satellite OLCBFA alpha ne semble pas présenter de profils différents selon qu'il est en présence ou non du betasatellite (Figure 13). En raison d'un problème technique, les profils d'ADNs de l'alphasatellite CLCuGA n'a pu être obtenu qu'en présence du betasatellite. Cependant on note que les profils sont les mêmes pour CA et OA en présence du betasatellite (Figure 13 et Figure 14). Dans le même échantillon 8 du traitement T+CA+b qui présentait un profil atypique lorsqu'il était révélé par la sonde betasatellite CLCuGB, on observe également un profil atypique comparable quand il est révélé avec la sonde CLCuGA. On remarque aussi la même variation d'intensité au cours du temps entre les deux formes.

Cette identité de profil atypique révélée par les sondes CLCuGA et CLCuGB pourrait s'expliquer par une recombinaison hétérologue qui aurait produit une chimère comportant des fragments de CLCuGA et de CLCuGB. Par ailleurs, des formes de poids moléculaires plus

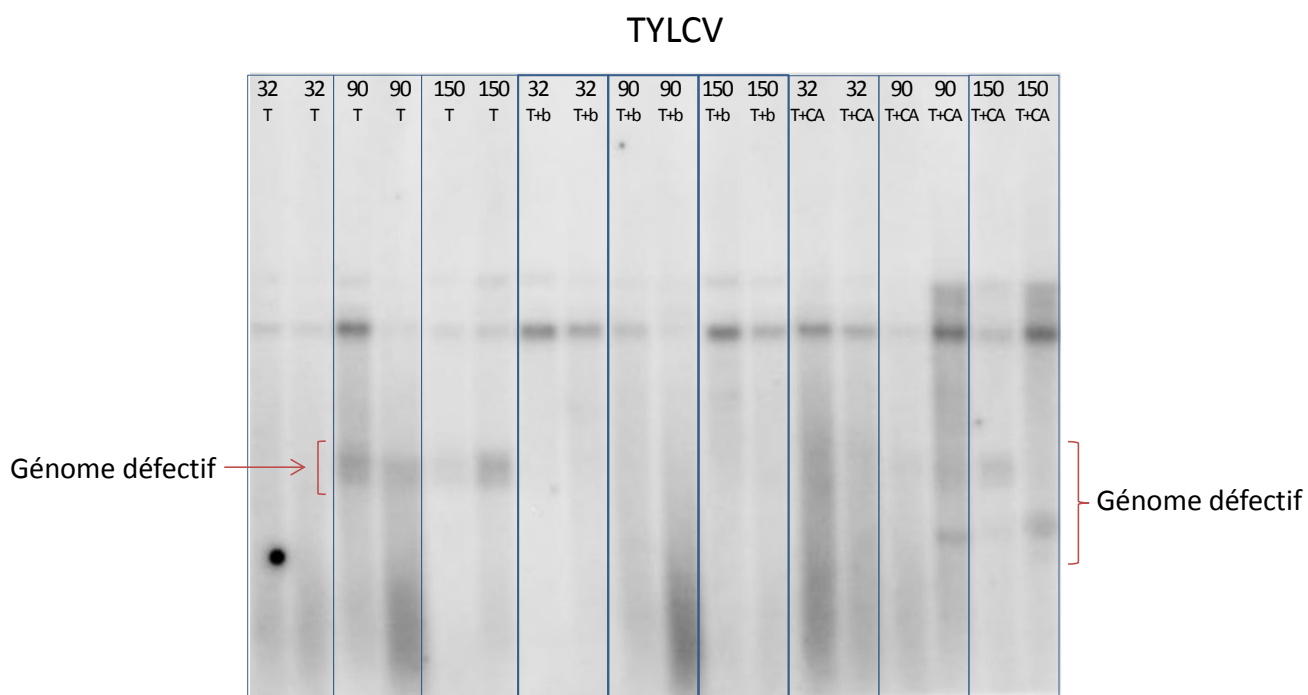


Figure 11: Analyse par Southern blot des ADN du TYLCV dans des extraits de tomates infectées par le TYLCV seul (T), le TYLCV+ CLCuGB (T+b) et le TYLCV+CLCuGA (T+CA), à 32, 90 et 150 jours après inoculation (dpi).

élevés sont détectées pour tous les échantillons et avec les deux alphasatellites. Comme pour le CLCuGB ces formes pourraient correspondre à des multimères, des recombinants ou à des formes hDNA.

Des échantillons de plantes récoltés à 32, 90 et 150 dpi dans les traitements TYLCV+B et TYLCV+CA ont été analysés à par Southern blot avec des sondes détectant les satellites CLCuGB et CLCuGA (Figure 15). En comparant les profils obtenus pour des échantillons récoltés à ces différentes dates on remarque que des ADNs défectifs apparaissent au cours du temps au détriment des formes génomiques complètes qui avaient été précédemment détectées dans les échantillons prélevés jusqu'à 32 dpi (Figure 12 et Figure 13). Ces ADNs défectifs sont représentés par une seule bande pour le betasatellite alors qu'on en distingue deux pour l'alphasatellite.

4.2.4. Analyse par PCR de la taille des génomes présents dans les plantes

Des génomes défectifs de taille discrète ont été détectés pour le TYLCV et pour les satellites CLCuGB et CLCuGA au stade tardif avec des analyses en Southern blot.

Le fait de pouvoir observer une bande discrète d'ADNs défectifs suggère l'existence d'un processus capable de réplication à partir d'une matrice de génome défectif comparable à celle des génomes complets, qui contiendrait les déterminants moléculaires identifiés comme indispensable à la réplication. Selon cette hypothèse, il serait donc possible d'amplifier ces génomes défectifs par PCR en plaçant des amorces dans la région intergénique située entre l'origine de réplication et le gène de la Rep pour le TYLCV, et dans la région SCR pour le CLCuGB. On suppose que ces régions sont conservées parce qu'elles codent pour des déterminants indispensables à leur réplication.

Comme les génomes défectifs d'alphasatellites ont été peu décrits, nous avons adopté la même logique que pour le TYLCV et le CLCuGB, en positionnant les amorces dans des régions supposées indispensables pour leur réplication. Les amorces ont été placées de part et d'autre de l'origine de réplication. Les amplifications ont été réalisées sur les extraits d'ADN de plantes infectées par le TYLCV, TYLCV+CLCuGB et TYLCV+OLCBFA, échantillonnées entre 32 et 150 dpi initialement pour les analyses de la dynamique d'accumulation du virus et de ces satellites par qPCR.

Dans le cas du TYLCV, nous n'avons pas réussi à trouver les conditions de PCR permettant d'amplifier le génome entier (Figure 16), probablement du fait de sa taille (environ 3000 pb) qui est relativement grande par rapport à celle des satellites. Cette hypothèse paraît cohérente avec le fait que nous avons pu amplifier des fragments d'environ 1500 pb et 1000 pb à partir de 120 dpi. Ces formes génomiques défectives amplifiées par PCR ont été détectées au temps tardifs (120 et 150 dpi) mais pas à 32 et 90 dpi. Ces résultats sont cohérents avec les analyses en Southern blots qui révélaient des génomes incomplets à 150 dpi mais pas à 32. Par contre, il est surprenant qu'à 90 dpi des génomes défectifs soient

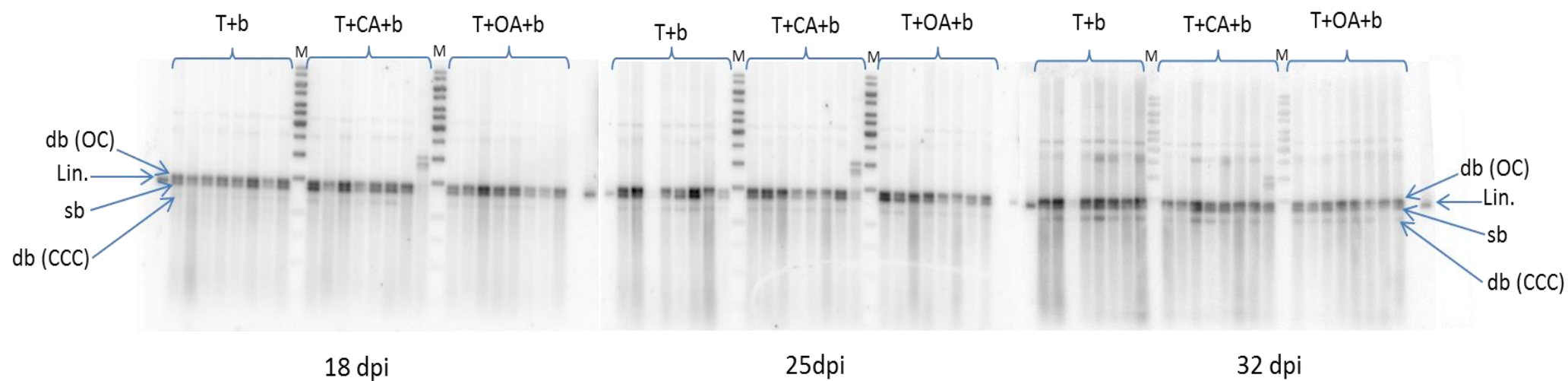


Figure 12: Analyse par Southern blot des ADNs de CLCuGB extraits de tomates infectées par différentes combinaisons 18, 25 et 32 jours après inoculation (dpi). TYLCV+CLCuGB (T+b), TYLCV+OLCBFA+CLCuGB (T+OA+b), TYLCV+CLCuGA+CLCuGB (T+CA+b). M : marqueur de taille 1 kb.

détectés par Southern blot et pas par PCR, une technique plus sensible. Cette incohérence peut être néanmoins expliquée par une faible efficacité de cette PCR qui n'a pas réussi à amplifier des génomes complets.

Dans les plantes co-infectées par le TYLCV et le CLCuGB une bande majoritaire d'environ 1300 pb a pu être amplifiée avec les amorces permettant de détecter le betasatellite, sur des échantillons prélevés à 32 dpi (Figure 17). Cette taille correspond à celle de génomes complets. Au temps tardifs, 4 et 5 mois, un produit d'amplification majoritaire de 1000 pb est détecté et la bande discrète à 1300pb n'est pas visible. Le produit de 1000 pb est rarement détecté à 32 dpi. L'interprétation d'une apparition de génomes défectifs au détriment du génome complet aux temps tardifs est cohérente avec les observations faites sur les Southern blot au stade tardif (Figure 15).

Les plantes co-infectées par le TYLCV et le CLCuGA ont été testées entre 30 et 150 dpi avec les amorces permettant de détecter le CLCuGA. Dès 32 dpi, on observe une bande majoritaire qui a la taille du génome complet (1300pb) mais aussi une bande de faible intensité d'environ 800 pb. Aux temps tardif, le profil des produits d'amplification s'enrichit de bandes supplémentaires et la bande à 1300pb supposée correspondre au génome complet est soit invisible ou d'intensité relativement faible. Les profils d'amplification du CLCuGA aux temps tardifs présentent plusieurs originalités par rapport au profil du betasatellite CLCuGB : (i) la bande discrète supposée correspondre au génome entier reste visible pour certains échantillons. (ii) deux produits de taille discrète et supérieure à celle du génome entier (1500, 1800pb) sont amplifiés. (iii) un génome défectif de 700 pb est amplifié en plus du génome défectif de 800 pb qui avait déjà été détecté à 32 dpi. (Figure 18). Ces profils d'amplification sont en cohérence avec les profils d'ADN génomique révélés par Southern blot pour le CLCuGA car on y détecte le même polymorphisme de taille avec deux types majoritaires de génome défectif et trois types majoritaires de génome complet ou « plus que complets » (Figure 15).

4.2.5. Séquençage des ADN subgénomiques

Afin de déterminer le niveau d'homogénéité des génomes défectifs, nous avons adopté la stratégie de séquençage directe des produits d'amplification. En supposant que les génomes défectifs d'une taille donnée sont quasi identiques, l'électrophorégramme devrait être interprétable (sans ambiguïtés) sur la totalité du génome. En revanche, si les génomes défectifs d'une taille donnée sont très hétérogènes, l'électrophorégramme sera rapidement illisible.

Pour le TYLCV et l'alphasatellite, nous n'avons pas réussi à obtenir des produits d'amplification suffisamment concentrés pour permettre un séquençage direct des produits amplifiés. Pour le betasatellite, après découpage sur gel de la bande majoritaire de 1000pb obtenue à partir des extraits de 150 dpi, et aussi, en guise de contrôle, la bande majoritaire

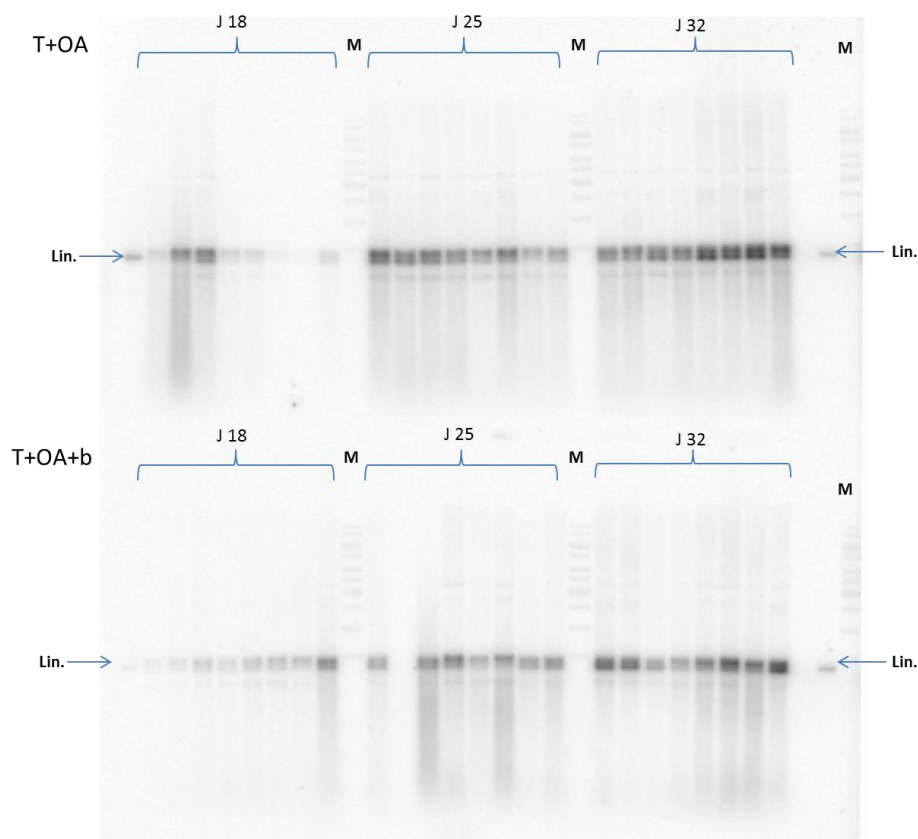


Figure 13: Analyse par Southern blot des ADN de CLCuGB extraits de tomates infectées par différentes combinaisons 18, 25 et 32 jours après inoculation (dpi). TYLCV+OLCBFA (T+OA), TYLCV+OLCBFA+CLCuGB (T+OA+b). M : marqueur de taille 1 kb. Lin : génome linéarisé du OLCBFA.

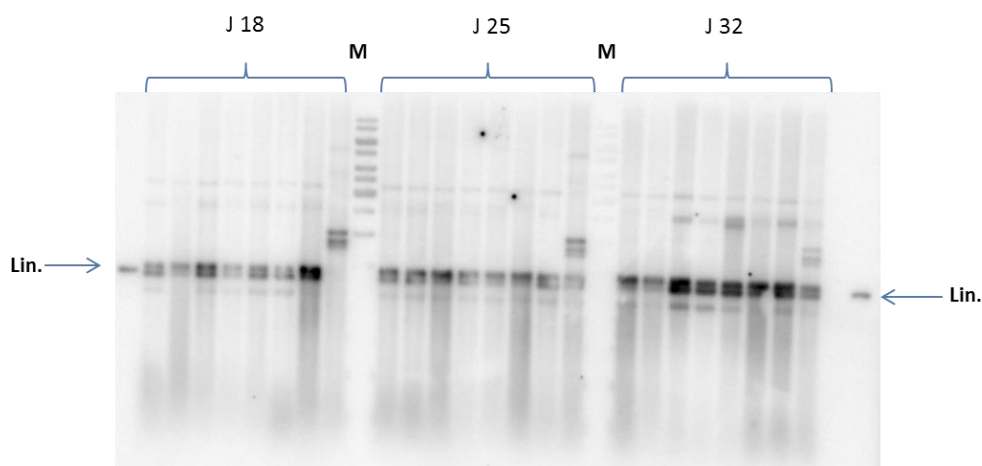


Figure 14: Analyse par Southern blot des ADN de CLCuGA extraits de tomates infectées par TYLCV+CLCuGA+CLCuGB (T+CA+b) 18, 25 et 32 jours après inoculation (dpi). M : marqueur de taille 1 kb. Lin : génome linéarisé du CLCuGA.

de 1300 pb obtenue à partir des extraits de 32 dpi, un séquençage a pu être effectué. Pour commencer, nous présentons le résultat du séquençage direct du produit d'amplification de 1300 pb correspondant à la taille complète du génome du CLCuGB (Figure 19). Pour des raisons liées au séquençage direct, une région de la SCR d'environ 100 nt dans laquelle sont positionnées les amorces utilisées n'a pas pu être déterminée.

La séquence du produit d'amplification présente 18 positions polymorphes par rapport à celles du clone infectieux qui a servi à infecter la plante : quatre mutations ont été détectées dans le gène de BetaC1, trois dans la région riche en A. Onze autres mutations présentaient un polymorphisme qui a été confirmé par le séquençage des deux brins de l'ADN amplifié (détection de deux pics de fluorescence). La séquence obtenue à partir d'un produit d'amplification de 1000pb dérivé d'un échantillon de feuille récolté à 150 dpi, correspond à une séquence de CLCuGB qui a perdu un fragment du génome compris entre les positions 202 et 632 (Figure 20). Cette délétion couvre la quasi-totalité du gène Beta C1 (548->195). On note aussi une délétion de 7 nucléotides à la position 1070 du génome du CLCuGB et 5 mutations ponctuelles distribuées sur l'ensemble de la séquence.

4.2.6. Analyse par Southern blot des ADN de TYLCV et de CLCuGB dans les plantes avant et après transmission par vecteur

Lors des expériences de transmission par vecteur décrits dans l'article (partie 2 de ce chapitre), des plantes sources de 32 et 150 dpi ont été utilisées pour transmettre le TYLCV ou la combinaison TYLCV+CLCuGB vers des plantes de tomate. Etant donné que les plantes infectées depuis 150 dpi avaient été montrées comme contenant une part non négligeable de formes défectives des génomes viraux et betasatellites (Figure 11 et Figure 15), nous avons regardé par Southern blot si ces formes étaient transmises par le vecteur *B. tabaci*.

Les profils d'ADN génomique des plantes sources utilisées pour la transmission (Figure 21) sont conformes à ce que nous avons précédemment obtenu avec des plantes du même âge (Figure 11 et Figure 15), notamment en ce qui concerne la détection d'ADN défectif. Ainsi, les plantes sources utilisées 150 jours après leur infection par le TYLCV présentent des génomes défectifs alors que les plantes de 150 dpi co-infectées par le TYLCV et le CLCuGB n'en montrent pas (Figure 21). On remarque cependant que la proportion de génome défectif de TYLCV semble plus faible que celle des plantes à 150 dpi précédemment analysées (Figure 11). En revanche, la proportion importante de génomes défectifs de CLCuGB dans les plantes sources de 150 dpi (Figure 21) est comparable à celle des plantes précédemment analysées (Figure 15).

Après transmission, les plantes tests sont échantillonnées à 32 dpi. Deux types de symptômes ont été observés au niveau des plantes infectées par vecteur : T1 correspond à un niveau de symptôme fort et T2 à un niveau faible. « β » indique les plantes qui présentent les symptômes sévères liés à la présence du betasatellite.

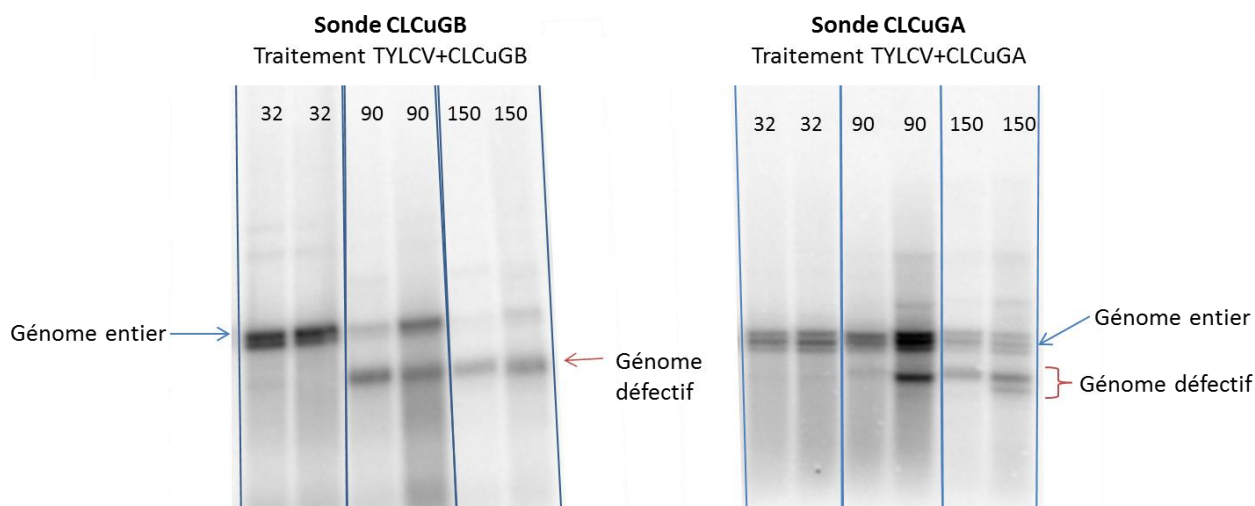


Figure 15: Analyse par Southern blot des ADN de CLCuGB et de CLCuGA dans des extraits de tomates infectées 32, 90 et 150 jours après inoculation (dpi).

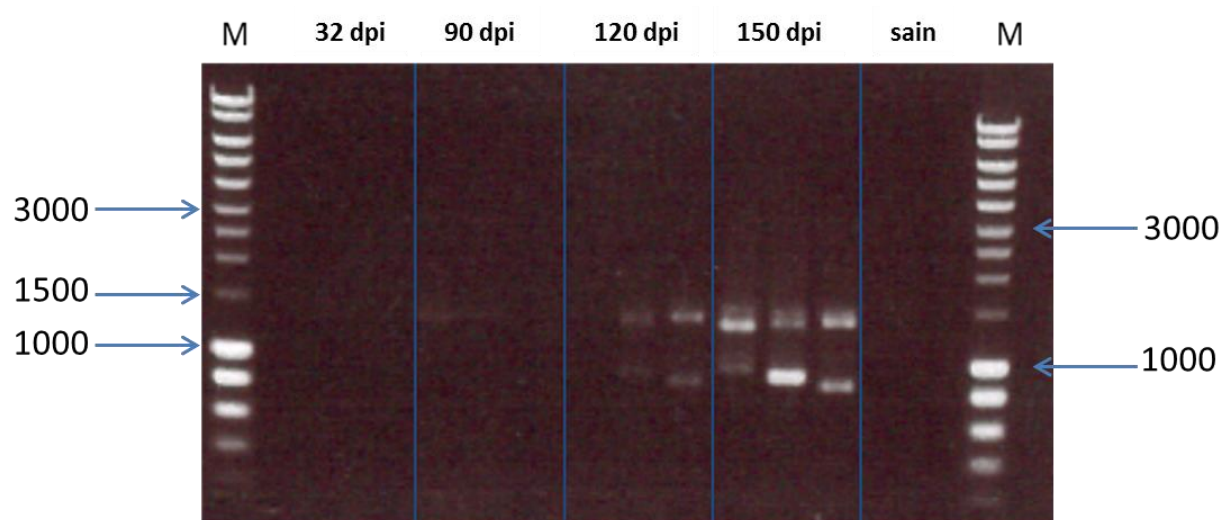


Figure 16: Amplification par PCR du génome total du TYLCV dans des échantillons infectés par le TYLCV et collectés 30, 90, 120 et 150 jours après inoculation (dpi). M : marqueur de taille 1kb

Dans le cas des transmissions à partir de plantes sources ne contenant pas de betasatellite, une grande hétérogénéité de formes génomiques a été observée entre les plantes test infectées. Ces différences sont principalement liées à des trainées d'ADN migrant plus ou moins rapidement par rapport aux formes génomiques habituelles (dbOC et sb) sans que nous puissions en donner une explication pour le moment. Aucune trace de génome défectif de l'ADN de TYLCV n'a été détectée dans les plantes tests infectées à partir d'une plante source de 150 dpi (VT). Ce résultat n'est cependant pas inattendu dans la mesure où la proportion de génomes défectifs était finalement relativement faible dans les plantes sources VT et notamment dans la plante 2 qui a servi de source pour les quatre plantes analysées. Nous n'avons pas réussi à associer un profil caractéristique d'ADNs génomiques du TYLCV selon les symptômes T1 et T2, ou selon l'âge de la plante source.

Dans le cas des transmissions à partir de plantes sources contenant le TYLCV et le CLCuGB, nous n'avons pas réussi à associer un profil caractéristique d'ADNs génomiques du TYLCV selon les symptômes T1, T2, et β , ou selon l'âge de la plante source. Par contre nous avons observé que le profil d'ADN génomique de TYLCV de deux plantes tests infectées par la plante source VTB3, comportait une très légère bande pouvant correspondre à des génomes défectifs. Le fait que cette bande inhabituelle ait été détectée sur deux plantes test, milite en faveur d'une forme transmise à partir de leur plante source commune.

Malgré la forte proportion de génome défectif de CLCuGB dans la plante source VTB3, aucun génome défectif de taille équivalente n'a été observé ni dans les plantes tests infectées à partir de VTB3 et présentant les symptômes caractéristique associés au betasatellite (β), ni dans celles présentant les symptômes de TYLCV. En revanche, on observe un génome défectif de taille plus grande dans deux plantes β . Une analyse complémentaire est nécessaire pour connaître leur nature.

4.3. Conclusion

Les analyses par Southern blot des extraits utilisés pour l'étude de la dynamique des ADN viraux et de satellites nous montrent que les satellites n'ont pas d'effet sur la nature des formes virales, quelle que soit la combinaison dans laquelle ils ont été co-infectés avec le TYLCV. Quand les plantes sont infectées depuis trois mois, il apparaît des génomes défectifs, non seulement du virus, mais aussi de l'alphasatellite CLCuGA et du betasatellite CLCuGB. Il est intéressant de noter que les génomes défectifs du CLCuGA étaient hétérogènes avec deux formes de taille discrète (700 et 800 pb), alors que ceux du CLCuGB étaient homogènes avec une seule forme de 1000pb. La forte hétérogénéité du CLCuGA aux temps tardifs a été confirmée par la détection de deux formes génomiques supplémentaires de taille discrète (1500 et 1800 pb) et dépassant la taille du CLCuGA (1300 pb). Nous avons pu confirmer par PCR et séquençage que la forme défective du betasatellite correspondait à un génome de CLCuGB ayant perdu son gène BetaC1. L'hypothèse d'une transmission de génomes défectifs

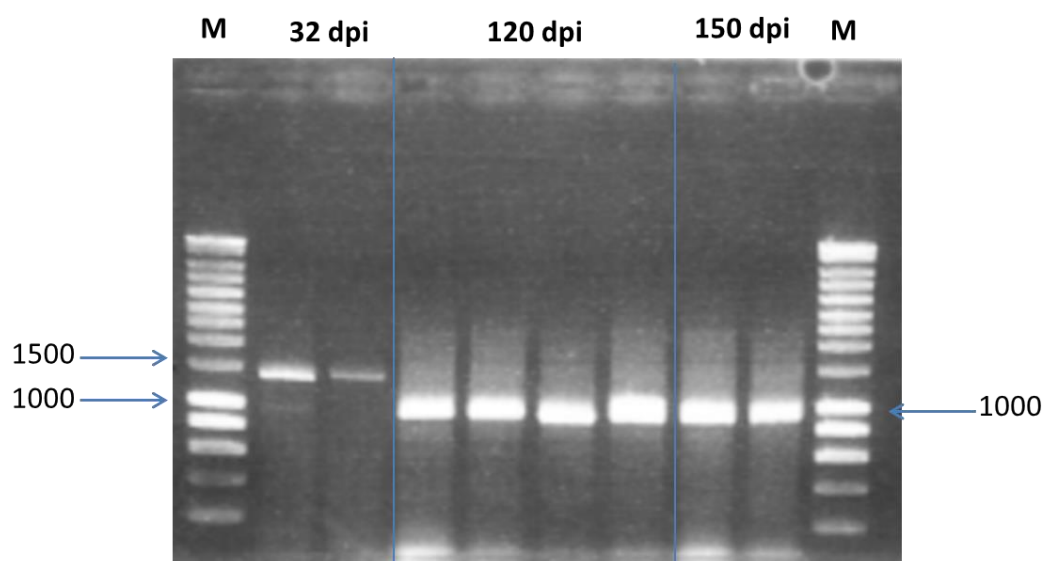


Figure 17: Amplification par PCR du génome total du CLCuGB dans des échantillons prélevés 32, 120 et 150 jours après inoculation (dpi). M : marqueur de taille 1kb.

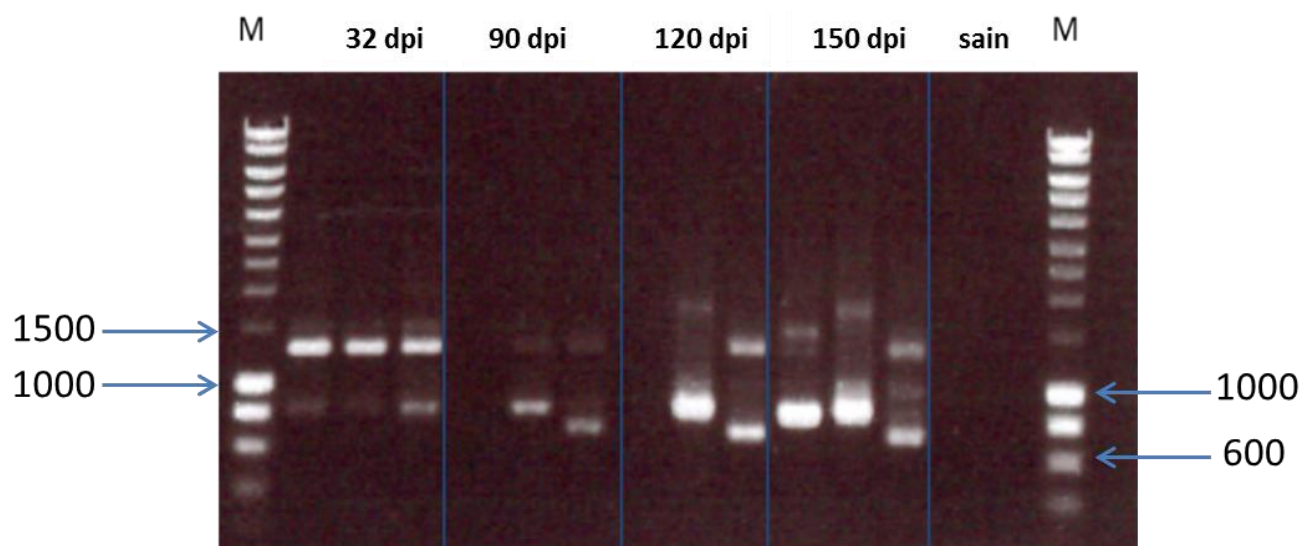


Figure 18: Amplification du génome total du CLCuGA par PCR dans des échantillons prélevés 30, 90, 120 et 150 jours après inoculation (dpi).

par le vecteur *B. tabaci* n'a pas pu être validée pour le virus. Par contre nous avons observé la présence de génomes défectifs de betasatellite sur des plantes infectées à partir de plante source de 150 dpi contenant principalement des formes défectives de betasatellite, et pas sur des plantes tests infectées à partir de plantes jeunes ne présentant pas d'ADN défectif.

5. Discussion

En réexaminant les résultats des dosages qPCR sous l'éclairage des résultats de Southern blot, on s'interroge sur l'influence de la position des amorces qPCR sur l'estimation des niveaux d'accumulation des ADNs viraux et satellites. En effet, suivant l'endroit choisi, l'estimation qPCR prendra plus ou moins en compte les génomes incomplets.

Dans le cas relativement simple des betasatellites où les génomes défectifs sont monomorphes et très majoritaires aux temps tardifs, le choix des amorces aura un impact considérable sur les dosages des betasatellites aux temps tardifs. Comme les amorces avaient été choisies dans le gène betaC1 pour ne tenir compte que des génomes « fonctionnels », le dosage qui a été fait avec ces amorces n'a tenu compte que de l'accumulation de génomes entiers ; en effet, les résultats de séquençage révèlent que c'est précisément la partie manquante des génomes défectifs. Ainsi, on constate une parfaite cohérence entre la chute importante des accumulations enregistrées par le dosage qPCR des betasatellites entre 32 dpi et 150 dpi d'une part (Figures 6 et 7 de l'article), et la diminution de l'intensité du signal pour le génome entier de CLCuGB par Southern blot à 150 dpi d'autre part (Figure 15).

Une question intrigante se pose alors sur un possible impact négatif de cette forte accumulation de génomes défectifs de betasatellites sur la génération de génomes défectifs de TYLCV. En effet, nous avons constaté que les génomes défectifs de TYLCV étaient indétectables jusqu'à 150 dpi dans des plantes co-infectées avec le betasatellite alors qu'ils étaient présents dans les plantes infectées par le TYLCV seul. Sans que l'on comprenne encore la portée de cette découverte, on peut supposer que les betasatellites et notamment la forme défective de 1000 pb remplisse une fonction sur le long terme que le virus n'a plus besoin d'assurer.

Pour l'alphasatellite CLCuGA les formes défectives de l'ADN sont plus polymorphes que ceux du CLCuGB et c'est entre autre pour cette raison que nous n'avons pas réussi à les séquencer. Comme pour le betasatellite, nous avons choisi des amorces ciblant le gène codé par le satellite, en l'occurrence, le gène Rep. Ceci permettait en cas de détection positive même faible du satellite, de supposer que ce qui est dosé est capable d'engendrer une descendance fonctionnelle. Même si nous ne pouvons pas dire pour le moment ce que dosent précisément les amorces ciblant le gène Rep, entre les génomes complets et incomplets, on peut néanmoins constater que les résultats de qPCR et de Southern blot convergent vers le fait que le betasatellite CLCuGB semble interagir d'avantage avec le virus assistant que l'alphasatellite CLCuGA. En effet, le dosage par qPCR montre que le CLCuGA n'a pas d'impact



Figure 19: Alignement de la séquence de CLCuGB avec celle du clone séquencé à partir de tomate infectée depuis 32 dpi. Flèches bleues : Position des amorces de Briddon utilisées pour le séquençage. Le trait rouge : le gene betaC1. Encadré = positions auquels de nombreux doubles pics sont visible sur le Chromastogramme.

négatif ni sur l'accumulation du virus ni sur l'accumulation du CLCuGB. Sa dynamique d'accumulation semble relativement stable au cours du temps, plus basse ou équivalente à celle du TYLCV jusqu'à 32 dpi et même légèrement supérieure à celle du TYLCV et du CLCuGB à 150 dpi (Figures 4, 5 et 6 de l'article).

Le CLCuGB a un fort effet délétère sur l'accumulation du virus en présence ou en absence d'alphasatellites. Les résultats de Southern blot semblent conforter cette différence d'interactions. Ils révèlent en effet que les génomes défectifs de CLCuGB semblent être sélectionnés pour une taille de 1000 pb de base qui semble être le signe d'une interaction forte avec le virus. Par contre, la présence de génomes incomplets de taille hétérogènes du CLCuGA et même de génomes plus longs que le génome natif suggère que l'alphasatellite jouit d'une plus grande autonomie.

La logique du choix des amorces pour le dosage du TYLCV a été basée sur deux études qui ont caractérisé les séquences de formes défectives de BCTV (Bach and Jeske, 2014) et du CLCuV (Liu et al., 1998) et suggéré que la région AC2 est la moins fréquemment détectées dans ces génomes défectifs. Selon le même principe que pour les satellites, en plaçant les amorces dans le gène AC2, nous avons théoriquement dosé surtout des génomes entiers. La dynamique d'accumulation du TYLCV que nous avons décrite au paragraphe 3 serait donc celle de génomes complets qui augmentent en fréquence jusqu'à un pic d'accumulation avant 32 dpi et diminuent ensuite à des temps tardifs (150dpi) à un niveau équivalent à celui détecté au tout premier temps de l'infection avant 18 dpi. Il est intéressant de noter qu'en dépit des interactions avec les satellites, cette dynamique d'accumulation ne varie pas d'un point de vue qualitatif. On peut donc supposer que le virus n'est pas profondément affecté par la présence des satellites ce qui peut être considéré comme étant à leur avantage sur le plan de l'assistance.

CLCuGB-FN554575 150dpi	ACCGTGGGCGAGCGGTTCTCGGAAGTAAATGGTGGGTCCAGCTATTGGGAATGGATGAAATCTTGGGAAATGGGCTAGATCCAAACCAATTGTTATA ACCGTGGGCGAGCGGTTCTCGGAAGTAAATGGTGGGTCCAGCTATTGGGAATGGATGAAATCTTGGGAAATGGGCTAGATCCAAACCAATTGTTATA	100 100
CLCuGB-FN554575 150dpi	TATAATTAATTTATGATTAAATTAATACTGCGTTAAATGATATTATAAACAGATAAGACATAAAATATTATTCTTACATATAATTTAAACATTACAC TATAATTAATTTATGATTAAATTAATACTGCGTTAAATGATATTATAAACAGATAAGACATAAAATATTATTCTTACATATAATTTAAACATTACAC	200 200
CLCuGB-FN554575 150dpi	CGATGATTTATTATGATGCGGTAATGATTTATGAGTTCCATGCCTAAATGTTGAGGTTCTCAGCCATTATCATATCCACCCTTCGACTAACTCCTCC CXX	300 300
CLCuGB-FN554575 150dpi	GTCTTGATCATCTGGTGAGTGGTGTCTTTGAACATATCTTTAAACCCATTATTATTTCCCTCCTCAGAGCCGTTAAAGTCGAATGGGATGAAGACATCAG XX	400 400
CLCuGB-FN554575 150dpi	CGAAGTTGATGGTATGATGAACGTTGATTTCCCTCAGATATGCCTCCTTTGTTGCCGTGACCTCTATCCTGCAGTCTATATGATCGTCTTTGAGGAAGAC XX	500 500
CLCuGB-FN554575 150dpi	ATCGACTCTGAAGTGGACTCCCTTGGTGCTCCTGAATGTAGTAGTCATTTTTATTATGTTTTGTGTGATCATCAACACGAAATATATAGATGATTCA XX	600 600
CLCuGB-FN554575 150dpi	AGAAAATATCTTTATGAGTATATGGATTAAATGAACAGCTATATCTTGTATTATCCATACATATTTGTCATCCATTACGTCATACAGGCTCATACGAT XX	700 700
CLCuGB-FN554575 150dpi	GTAAGCATCGTAAGAGAAAAAATAAGAGAGAAAAATCAATAACAAGAAATAATTATAATTTAGAAAAAACAAGGAGCGCAGCGAAAAAACA GTAAGCATCGTAAGAGAAAAAATAAGAGAGAAAAATCAATAACAAGAAATAATTATAATTTAGAAAAAACAAGGAGCGCAGCGAAAAAACA	800 800
CLCuGB-FN554575 150dpi	CCCGAACAGACAAATAAATAAATAAGAAAAAGAAAAATGTACAAGTGTCTTCAGAACCACTTGGTTGAAAAAAGAAAAACATTAATTCGGTACTA CCCGAACAGACAAATAAATAAATAAGAAAAAGAAAAATGTACAAGTGTCTTCAGAACCACTTGGTTGAAAAAAGAAAAACATTAATTCGGTACTA	900 900
CLCuGB-FN554575 150dpi	TCATACTATGTCGCTTTATTGAACGCCGCTACTTAAAGCACTATTGAAGTTGTATACGAAATCCCTGTTCCCGTATGTTAGTGGGTGATGACTGGATA TCATACTATGTCGCTTTATTGAACGCCGCTACTTAAAGCACTATTGAAGTTGTATACGAAATCCCTGTTCCCGTATGTTAGTGGGTGATGACTGGATA	1000 1000
CLCuGB-FN554575 150dpi	TTACGGTGTACTGTTAACCGTTCCGTTTTATCTTTACCCGTTCCGTTATTGAGTACCAATCCGTTATTGAGTACCGATATATCGGTACCAATTGGGT TTACGGTGTACTGTTAACCGTTCCGTTTTATCTTTACCCGTTCCGTTATTGAGTACCAAT.....TGAGTACCGATATATCGGTACCAATTGGGT	1100 1093
CLCuGB-FN554575 150dpi	CTCATATCCGTACATATATACCCTTTTGACGAAAAACCCCTCAAAAAGCTGAGATAAGAGGCGCGTGCAATTGCGCTGAAAAAGTTAAACATTCTCTCTCC CTCATATCCGTACATATATACCCTTTTGACGAAAAACCCCTCAAAAAGCTGAGATAAGAGGCGCGTGCAATTGCGCTGAAAAAGTTAAACATTCTCTCTCC	1200 1193
CLCuGB-FN554575 150dpi	TATTTCCGGTGAAACTATCATTTCGGGTGGTGGCGGCTCAAATCAGACACGCGCGGTTGTACCCCTGGGAGGGTAGAAATCACTACGCTACGC TATTTCCGGTGAAACTATCATTTCGGGTGGTGGCGGCTCAAATCAGACACGCGCGGTTGTACCCCTGGGAGGGTAGAAATCACTACGCTACGC	1300 1264
CLCuGB-FN554575 150dpi	AGCAGCCTTAGCTACGCCGAGCTTAGCTCGCCACGTTCTAATATT	1347 1264

Figure 20: Alignement de la séquence de CLCuGB avec celle du clone séquencé à partir de tomate infectée depuis 150 dpi. Flèches bleues : Position des amorces de Briddon utilisées pour le séquençage. Le trait rouge : le gène betaC1. xxx : les positions nucléotidiques délétées sur la séquence du clone défectif.

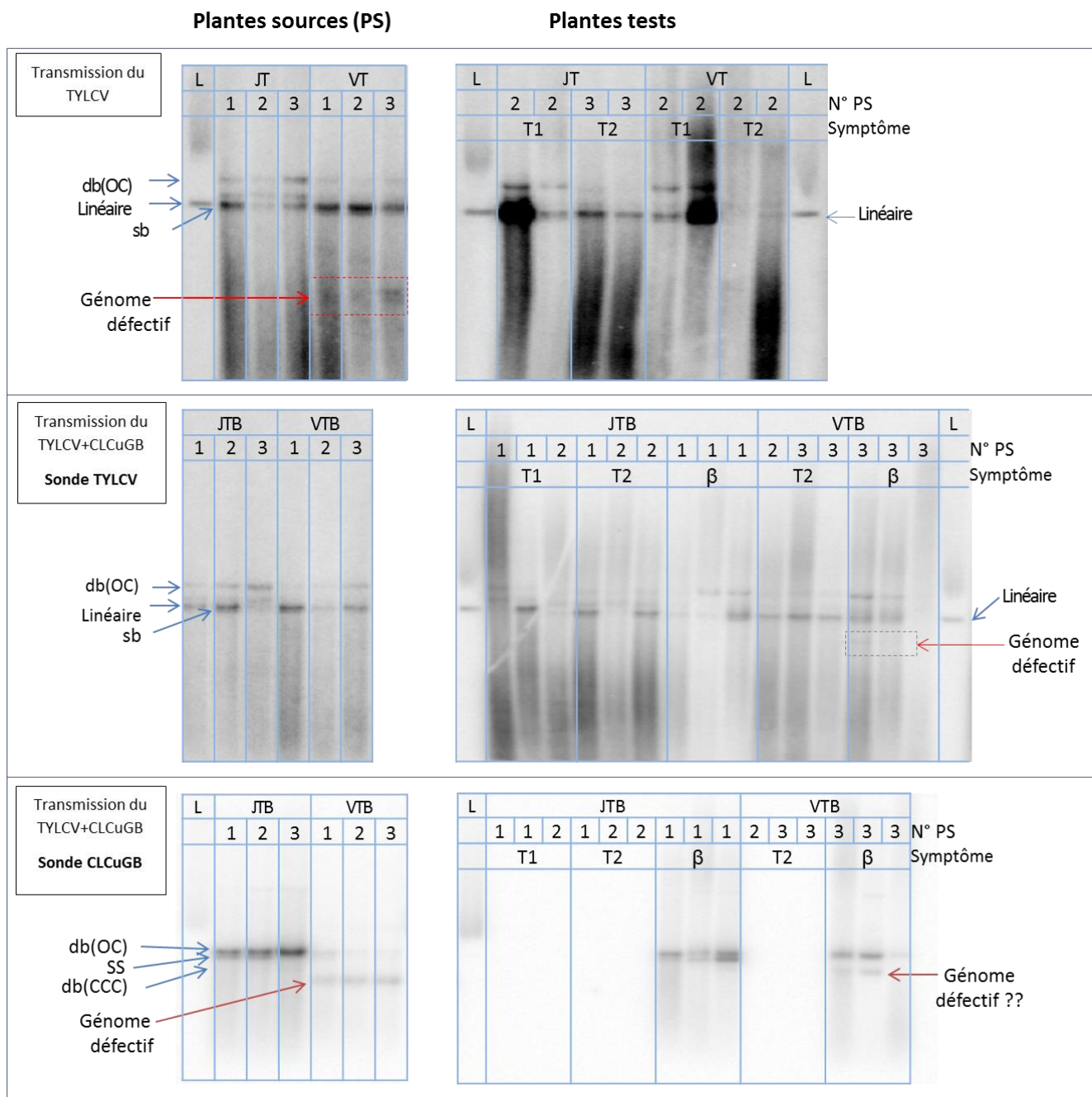


Figure 21 : Analyse par Southern blot des ADN du TYLCV et de CLCuGB dans les plantes utilisées lors du test de transmission (Exp. V3). JT : plantes sources infectées par le TYLCV depuis 32 jours; VT : plantes sources infectées par le TYLCV depuis 150 jours ; JTB : plantes sources infectées par le TYLCV+CLCuGB, depuis 32 jours VTB : plantes sources infectées pat le TYLCV+CLCuGB depuis 150 jours. Symptôme observé sur les plantes tests : T1 = symptômes typiques TYLCV : T2= symptômes TYLCV légers. β : symptôme typique lié à la présence du CLCuGB. L : génome de TYLCV linéarisé. Sain : extrait de plante saine.

CHAPITRE II : COMPARAISON DE L'EFFET D'UN BETASATELLITE SUR DEUX SOUCHE DU TYLCV PRESENTES EN MEDITERRANEE (LE TYLCV MLD ET TYLCV-IL)

1. Contexte et objectif

Dans le chapitre précédent, nous avons développé des outils nous permettant de suivre et de comparer les dynamiques d'accumulations d'un begomovirus et d'ADNs satellites. Nous avons ainsi montré qu'en présence du Cotton leaf curl betasatellite (CLCuGB), l'accumulation du TYLCV-Mld sur tomate était significativement plus faible que celle du TYLCV-Mld seul et ceci sur la période 18- 32 dpi. . Cependant (Kon et al., 2009) avaient observé que la présence du CLCuGB augmentait de 35% l'accumulation de la souche IL du TYLCV dans les plants de tomate (la date d'analyse des échantillons n'est pas précisée). Il n'était pas possible de savoir si la différence entre leurs résultats et les nôtres était due à la souche virale, au clone de CLCuGB utilisé ou à des différences de conditions expérimentales.

Dans la première partie de ce chapitre, nous présentons une expérimentation qui a été conçue pour tester si cette différence de comportement pouvait être liée aux souches de TYLCV. Les résultats de cette expérimentation sont présentés sous la forme d'un article intitulé « Differential impact of Cotton leaf curl Gezira betasatellite on within-host DNA accumulation of Israel and Mild strains of Tomato yellow leaf curl virus » soumis à Archives of Virology le 14 Octobre 2015. Le clone utilisé pour la souche Mld est le même que celui utilisé pour les expérimentations décrites dans le chapitre I et le clone de la souche TYLCV-IL est un clone qui était déjà disponible au laboratoire sous forme de clone infectieux. Les deux clones sont originaires de la Réunion (Delatte et al., 2005). Des résultats complémentaires, fournis à la suite de l'article, présentent les accumulations détaillées du betasatellite et les dynamiques d'accumulation virale comprenant le temps tardif de l'infection à 150 dpi.

2. Article 2

Differential impact of cotton leaf curl Gezira betasatellite on within-host DNA accumulation of Israel and Mild strains of tomato yellow leaf curl virus

Déborah CONFLON¹, Martine GRANIER¹, Fidèle TIENDREBEOGO^{2,3}, Pascal GENTIT⁴,
Michel PETERSCHMITT¹ and Cica URBINO¹

Soumis le 14 octobre 2015 à *Archives of Virology*

Differential impact of Cotton leaf curl Gezira betasatellite on within-host DNA accumulation of Israel and Mild strains of tomato yellow leaf curl virus

Déborah CONFLON¹, Martine GRANIER¹, Fidèle TIENDREBEOGO^{2,3}, Pascal GENTIT⁴, Michel PETERSCHMITT¹ and Cica URBINO¹

¹CIRAD, UMR BGPI, F-34398 Montpellier, France

²Laboratoire de Virologie et de Biotechnologies Végétales (LVBV), INERA, 01 BP 476 Ouagadougou 01, Burkina Faso

³Laboratoire Mixte International Patho-Bios, IRD-INERA, 01 BP 476 Ouagadougou 01, Burkina Faso

⁴ANSES, Plant Health Laboratory, Unité de Bactériologie, Virologie et détection des OGM, 7 rue Jean Dixméras, 49044 Angers Cedex 01, FRANCE

Corresponding author: cica.urbino@cirad.fr

Abstract

Most Old World begomoviruses are associated with circular ssDNA betasatellites. Although betasatellites are generally reported to have a positive impact on DNA accumulation of the helper virus, some rare reports suggest a negative effect in some cases. Interestingly, with Tomato yellow leaf curl virus, the impact was apparently negative for the Mild (Mld) strain whereas a positive impact was shown with the Israel (IL) strain in distinct reports. To further investigate the negative impact of a betasatellite on its helper virus, we compared the impact of Cotton leaf curl Gezira betasatellite (CLCuGB) on DNA accumulation of TYLCV-Mld and TYLCV-IL. We report for the first time that betasatellites can have a negative impact on viral DNA accumulation of their helper virus (TYLCV-Mld), and show the contrasting effect of CLCuGB on viral DNA accumulation of TYLCV-IL and TYLCV-Mld irrespective of host species (tomato or *Datura stramonium*). As the major genetic difference between the IL and Mld strains resides at the 5' ends of the Rep gene and the intergenic region, the possible contribution of this region to an efficient begomovirus/betasatellite interaction is discussed.

INTRODUCTION

Plant viruses of the genus Begomovirus (family Geminiviridae) have one or two genomic circular single-stranded (ss) DNA components of about 2.8 kb each, and are transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci*. Most Old World monopartite begomoviruses are detected with circular ssDNA molecules of about 1.3 kb reported as betasatellites [3, 22]. Betasatellites are detected only rarely with bipartite begomoviruses and have not been reported from the New World. They are considered as DNA satellites because they rely on begomoviruses for their encapsidation, replication, movement and spread by *B. tabaci*. The betasatellite genome encodes a protein (betaC1) that acts as a symptom/pathogenicity determinant. betaC1 was reported as a suppressor of PTGS (post-transcriptional gene silencing) and is suspected to be involved in begomovirus movement in plants [1, 29, 34]. For some begomoviruses, like *Ageratum yellow vein virus*, betasatellites are required for symptomatic infection of the host [35]. However, betasatellites are dispensable for symptomatic infection with some begomoviruses (Tomato leaf curl Ghana virus (ToLCGV) [16], Tomato yellow leaf curl Mali virus (TYLCMLV), [7]); these helper viruses are not always detected with betasatellites in the wild. The fact that some monopartite begomoviruses were never reported with a betasatellite does not necessarily mean that they are not capable of assisting betasatellites. For example, the two most common strains of *Tomato yellow leaf curl virus* [TYLCV-Israel (IL) and -Mild (Mld)] have never been detected with a betasatellite but were shown experimentally to transreplicate readily various betasatellites [15, 39, 41]. The severity of the symptoms exhibited by tomato and *Nicotiana benthamiana* plants coinfecting with TYLCV and betasatellites increased substantially in comparison to those of plants infected with virus only.

Although it has not been fully demonstrated, betasatellites are supposedly replicated by the same mechanism as that reported for viral genomes. Replication of virus genome relies on an interaction between the replication-associated protein (Rep) encoded by the C1 gene of begomoviruses and tandemly repeated motifs (iterons) located in the intergenic region (IR), at variable distances from the conserved stemloop of each virus component [10, 19]. The recognition between Rep and iterons of a cognate genome is usually specific, limiting Rep transreplication to its own genome, which includes the B component in bipartite begomoviruses [5, 6]. Although betasatellites do not encode a Rep and do not contain the iteron sequences of their helper viruses, they can be transreplicated by diverse begomoviruses [15, 25, 36]. For instance, Cotton leaf curl Multan betasatellite is transreplicated naturally by seven distinct begomoviruses [24], and five betasatellites were shown to be transreplicated

following co-inoculation with three distinct species of tomato-infecting begomoviruses [31]. Iteron-like sequences detected in various betasatellite sequences have been proposed to be involved in Rep binding [11, 23, 36] but the recognition process seems to be more relaxed than that seen between geminivirus strains or species [23].

Interactions between begomoviruses and betasatellites reportedly enhance the DNA level of the helper virus [13, 17, 18, 35, 38]. This beneficial effect on the virus could be explained by enhanced movement [34], or suppression of host defenses (e.g. gene silencing), mediated by betaC1. Although the negative impact of betasatellites on viral DNA accumulation has not been stated explicitly, there are several reports where it may be deduced from presented Southern blot data: *Eupotarium yellow vein virus* with its cognate betasatellite in *Nicotiana benthamiana* [36], *Tomato leaf curl Bangalore virus* (ToLCBaV) with Luffa leaf distortion betasatellite in tomato plants [38] and TYLCV-Mld with Ageratum yellow vein betasatellite (AYVB) in tomato plants [39]. The objective of the present study was to investigate this possible negative impact of betasatellites on viral DNA accumulation and, more specifically, to test if it is due to the betasatellite, the virus or the host plant. The tests were carried out with TYLCV as helper virus because contrasting results have been reported with TYLCV-IL and TYLCV-Mld strains regarding their viral DNA accumulation in co-infection with betasatellites [15, 39]. Thus, unlike AYVB, which seems to have a negative impact the DNA accumulation of TYLCV-Mld [39], the Cotton leaf curl Gezira betasatellite had a positive impact on DNA accumulation of TYLCV-IL [15]. However, as these tests were carried out in two separate laboratories with different betasatellite species, it is unclear if the contrasting impact on virus accumulation is due to different experimental conditions, the betasatellite species used or the virus strains themselves. Therefore, to disentangle the effects of these different factors, we designed a new test in which a representative of CLCuGB, one of the previously used betasatellite species, was co-infected with representatives of TYLCV-IL and TYLCV-Mld under the same experimental conditions. A possible host plant effect was also tested by comparing tomato and *Datura stramonium*. Our results confirm that betasatellites can have a negative impact on viral DNA accumulation of their helper virus, and show a contrasting effect of CLCuGB on viral DNA accumulation of TYLCV-IL and TYLCV-Mld irrespective of host species. As the major difference between the IL and Mld strains is due to a recombination within the 5' end of the Rep gene and the 5' end of the intergenic region (IR), the possible involvement of this region in an efficient begomovirus/betasatellite interaction is discussed.

MATERIALS AND METHODS

Agroinfectious clones of TYLCV-IL, TYLCV-Mld and CLCuGB

The clones TYLCV-Mld[RE:02] and TYLCV-IL[RE:Re4:04] (EMBL accession nos. AJ865337 and AM409201, respectively) were isolated from tomato plants (*Solanum lycopersicum*) sampled in Réunion Island in 2002 and 2004, respectively, and have been used in previous studies as agroinfectious clones [8, 20, 26, 27]. However, as preparation of an agroinfectious clone of TYLCV-IL[RE:Re4:04] has not been described to date, we provide this description here. The *Nco*I-restricted full-length genome, and a *Nco*I/*Eco*RI 0.9-mer genome fragment were generated. The 0.9-mer fragment was ligated into an *Nco*I/*Eco*RI double-restricted pCambia0380 vector and the *Nco*I-restricted full-length genome was ligated into the recombinant *Nco*I-restricted vector. The 1.9-mer genome was introduced into a clone of *Agrobacterium tumefaciens*, strain C58 MP90, via electroporation.

The CLCuGB clone (EMBL accession no. FN554575) was isolated from an okra plant in Burkina Faso and cloned as a *Pst*I-restricted full-length genome into the vector pGEMT [37]. An agroinfectious clone was prepared in this study as follows: the *Pst*I-restricted full-length genome was ligated as a tandem repeat into the unique *Pst*I restriction site of the vector pCambia2300. An *A. tumefaciens* clone of strain C58 MP90 was transformed as above.

Agroinoculation and plant growth conditions

The transformed *A. tumefaciens* clones were grown at 28°C in liquid LB medium containing kanamycin (50 mg/mL) and gentamycin (20 mg/mL). After about 26 h, when suspensions reached optical densities (OD) of about 3–5, the agrobacteria cultures containing the infectious TYLCV-IL, TYLCV-Mld and CLCuGB genomes were adjusted to identical ODs with LB medium. The equally concentrated IL and Mld cultures were centrifuged 20 min at 1,000 *g* and each pellet was resuspended with water (same volume as the centrifuged volume) containing 150 mM acetosyringone and 10 mM MgCl₂. For mixed virus-satellite infections the same procedure was used except that the same volumes of equally concentrated agrobacteria cultures containing the infectious virus and CLCuGB genomes were mixed before centrifugation. The resuspension volume of the mixed inocula was such that viruses were inoculated at the same agrobacterial concentration in mixed and single infections. Fourteen-day-old tomato plants of the susceptible cultivar ‘Monalbo’ were agroinfiltrated in cotyledons [40]. Each of the following combinations of agroinfectious cultures was inoculated onto 20 tomato plants: TYLCV-Mld (Mld), TYLCV-Mld+CLCuGB (Mld+B), TYLCV-IL

Table 1 Description of real-time PCR primers

Primer ID	5'- 3' sequence	Targeted region	Amplicon length	Annealing T°
TYLCV-1431-fw TYLCV-1576- rev	AAACGCCATTCTCTGCC CACAAGATAGCCAAGAAGAAACC	AC2/AC3 TYLCV genes (IL and Mld)	124 bp	60°C
CLCuGB-343-fw CLCuGB-424-rev	AACCCATTCATTATTTTC CGTTCATCATACCATA	betaC1 gene	81 bp	52°C
25S-RNA-1137- fw 25S-RNA-1297-rev	GTTGATTCGGCAGGTGAGTTGT AGAACTGGCGATGCGGGATG	25S-RNA gene	161 bp	60°C

(IL), TYLCV-IL+CLCuGB (IL+B). For each combination, infected plants were sampled at 18, 32 and 43 days post inoculation (dpi). Each plant sample consisted of five 4-mm-diameter leaf disks from the youngest leaf for which five leaflets were visible. Samples were conserved at -80°C until DNA quantification with real-time PCR (qPCR). The number of plant samples analyzed with qPCR is given in Table S1.

The same experiment was conducted with 30-day-old *Datura stramonium* plants except that the agrobacterial suspensions were injected into the stem. A total of 5–8 plants infected with each of the different combinations described above were analyzed with qPCR at 18 and 25 dpi.

Plants were grown in containment chambers with 14 h light at 26°C , and 10 h dark at 24°C , and were irrigated with 15:10:30 NPK+ oligoelements.

Extraction of total DNA

Total DNA was extracted using a modification of a reported protocol [9]: each leaf sample was ground in 400 μL of 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), containing 50 mM EDTA, 500 mM NaCl and 1% (weight/vol) SDS. The extract was incubated at 65°C for 10 min and centrifuged at 16,000 g for 10 min. One volume of isopropanol was added to the supernatant. The mix was centrifuged at 16,000 g for 20 min and the pellet washed with 70% ethanol. The pelleted DNA was resuspended in 50 μL sterile water and stored at -20°C if not used immediately.

Quantitative PCR conditions

The total amount of virus and betasatellite in each plant sample was determined by SYBR Green real-time qPCR. The 10 μL reaction mixture consisted of 5 μL LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBR green I kit Mix (Roche, Germany), 0.3 μM of each primer (Table 1), and 2 μL of a 1/100 dilution of the template DNA extract. The same primers were used to quantify DNA accumulation of the IL and Mld strains of TYLCV. The primers for quantification of CLCuGB DNA were targeted to the betaC1 gene—a unique gene encoded by the satellite; it was therefore expected that the satellite DNAs measured by qPCR would consist mostly of functional genomes. Two technical replicates per sample were amplified. Amplification conditions were 95°C for 10 s followed by 40 cycles of 10 s at 95°C , 30 s at the annealing temperature (Table 1) and 20 s at 72°C . To standardize all measurements of viral and satellite DNA accumulation, we quantified the amount of plant DNA in each extracted sample by targeting the endogenous 25S RNA gene in a parallel qPCR; the

amplification conditions were the same as above except that the annealing time was 20 s. PCR efficiencies were assessed with standard curves obtained by the amplification of serial tenfold dilution of the recombinant plasmids containing each target sequence; efficiencies ranged from 88% to 93%. All PCR fluorescence data were analyzed using the 2nd derivative max function of the LightCycler480 Software and the program LinRegPCR, [33] coupled to Pfaffle's quantification model [28].

The starting concentration of the target, called N0, is expressed in arbitrary fluorescence units per sample. N0 was calculated for each well from the values of the fluorescence threshold (Ft), the mean PCR efficiency of the qPCR plate concerned (E_{mean}) derived from the individual well efficiencies, and the fractional number of cycles needed to reach the fluorescence threshold (Ct):

$$N0 = Ft / E_{\text{mean}}^{Ct}$$

After checking key quality control points, technical replicates, and negative and positive controls, a calibrated fluorescence value (CV) was calculated for virus and satellite (referred to as target) for each sample, using the N0 of the endogenous 25S RNA gene:

$$CV = \frac{N0 \text{ target}}{N0 \text{ 25s}}$$

As CV is the ratio of numbers having the same arbitrary fluorescence unit, CV has no unit and was used only to define relative DNA accumulation.

Finally, as SYBRTM Green I is a dsDNA intercalating molecule [43], the fluorescence of an amplicon depends on its size. To weight the CV values according to the size of the satellite and virus amplicons, a size-relative CV (CV_r) was calculated:

$$CV_r = \frac{CV}{\text{size of the amplified fragment (bp)}}$$

A positive detection threshold for the viruses and the satellite was determined as 3 times the mean N0 of 7 healthy plant samples tested with the corresponding primer pairs.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R Studio software, version 3.0.3. [30]. At each of the three sampling time points (18, 32 and 43 dpi) in tomato plants, ANOVA tests were used to compare DNA accumulation (after a log transformation of CV_r data) of the same target between different groups of plants. Kruskal-Wallis rank sum tests were used to

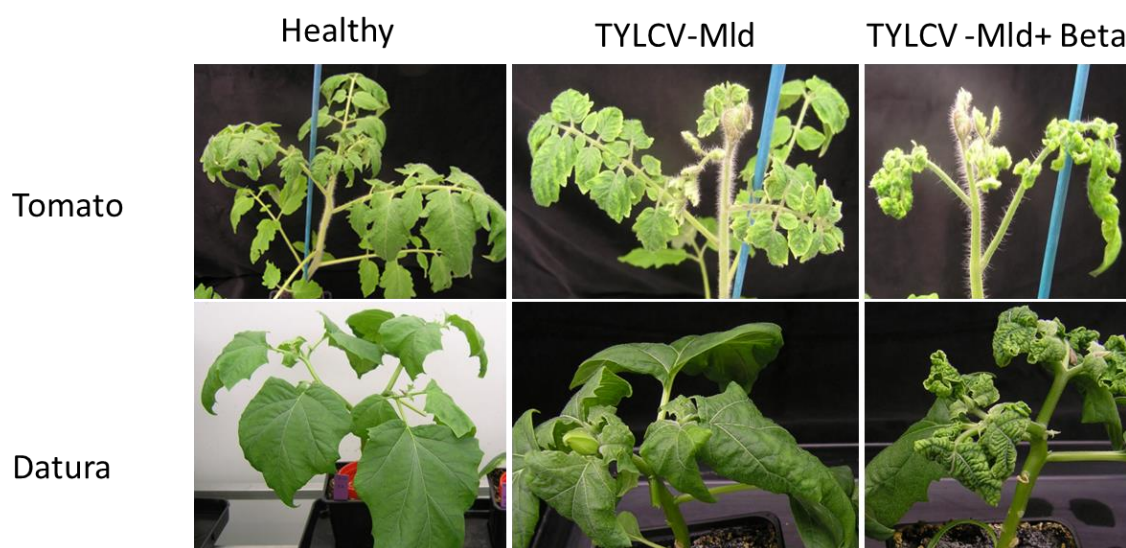


Fig. 1 Tomato and *D. stramonium* plants, either healthy or infected with TYLCV-Mld, or with TYLCV-Mld+CLCuGB.

compare virus and satellite DNA accumulation in *D. stramonium* at 18 and 25 dpi. The nature and results of each statistical test are indicated in the Results.

RESULTS

Virus symptoms

Tomato and *D. stramonium* plants were agroinoculated with TYLCV-IL or TYLCV-Mld, either alone or with CLCuGB. The inoculations were 100% successful. Tomato plants infected with IL or Mld exhibited an undistinguishable typical yellow leaf curl symptom (Fig. 1). Tomato plants co-infected with the betasatellite, irrespective of the virus strain, exhibited clearly distinct symptoms with severe downward leaf curling and stunting. Similarly, *D. stramonium* plants infected with IL or Mld exhibited undistinguishable mild downward leaf curling whereas plants co-infected with the betasatellite showed clearly distinct symptoms, again irrespective of the virus strain, including severe leaf distortion, curling, crumpling, and stunted plant growth (Fig. 1).

DNA accumulation of TYLCV-Mld and TYLCV-IL in tomato plants

DNA accumulation of TYLCV-IL, TYLCV-Mld and CLCuGB was estimated by qPCR in tomato samples collected at 18, 32 and 43 dpi. In plants infected with Mld only, the accumulation of viral DNA ranged from 1.6×10^{-3} to 2.5×10^{-3} between 18 and 43 dpi (Table 2, Fig. 2). DNA accumulation of IL was about 3 times lower at around 0.6 to 0.8×10^{-3} between 18 and 43 dpi. TYLCV-Mld viral DNA was up to 3 times lower in plants infected with Mld+B than with the virus alone (0.8×10^{-3} vs 2.4×10^{-3} at 32 dpi and 43 dpi); this difference was significant at all dates (Table 2). In contrast, TYLCV-IL DNA accumulation was generally similar in IL+B and IL-infected plants (0.6 to 0.8×10^{-3}) except at 32 dpi where viral DNA accumulation was 1.6 times higher in IL+B-infected plants (1.3×10^{-3} versus 0.8×10^{-3} , $p=0.001$, Table 2).

The amount of betasatellite DNA increased with time but was similar in plants infected with IL+B or Mld+B at 18 dpi (0.3×10^{-3} versus 0.8×10^{-3} , ANOVA, $df=1$, $F=2.49$, $p=0.127$) and 43 dpi (7.9×10^{-3} versus 6.4×10^{-3} , ANOVA, $df=1$, $F=0.669$, $p=0.422$). At 32 dpi, however, the amount of CLCuGB DNA in Mld-infected plants was slightly higher (1.6-times) than that in IL-infected plants (3.7×10^{-3} versus 5.9×10^{-3}); this difference was marginally significant (ANOVA, $df=1$, $F=4.58$, $p=0.042$).

DNA accumulation of TYLCV-Mld, and TYLCV-IL, in D. stramonium

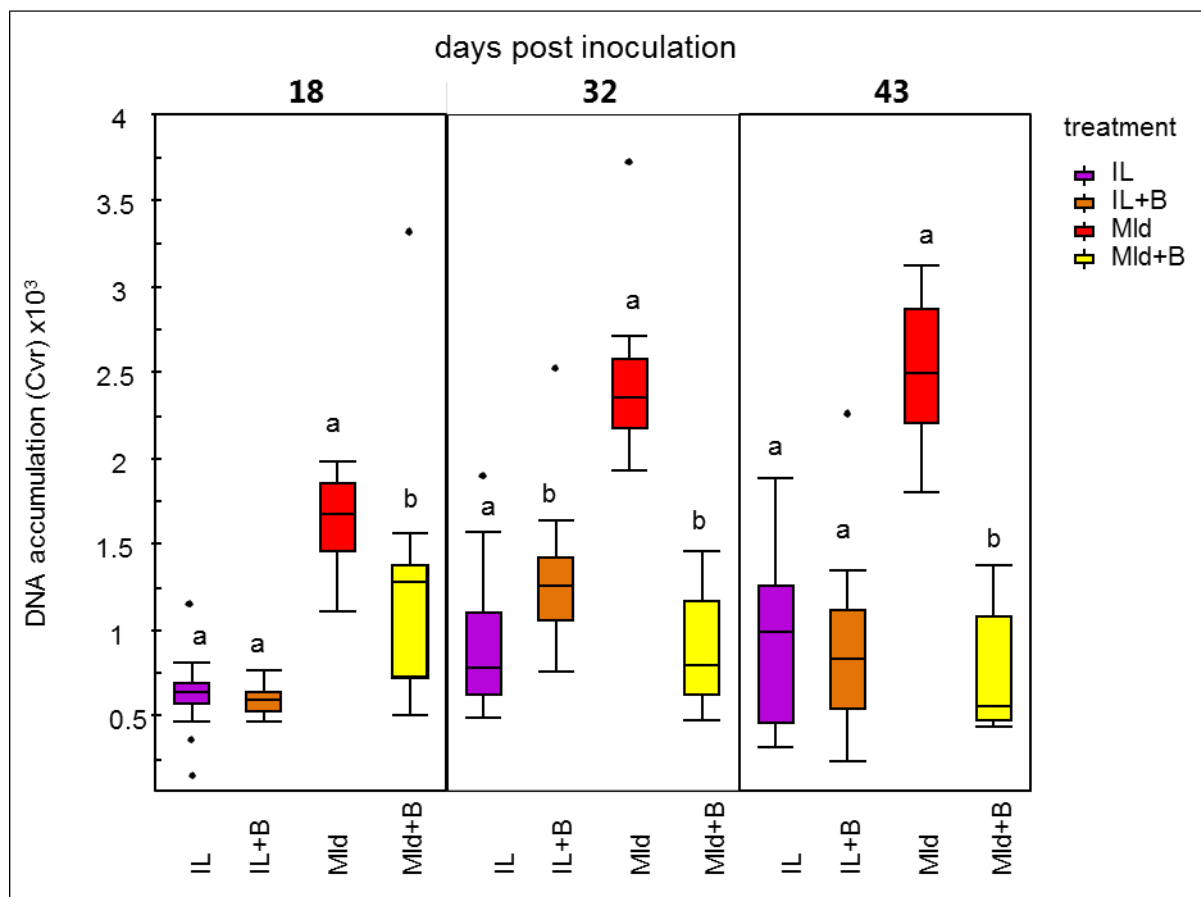


Fig. 2 Virus accumulation in tomato plants infected with TYLCV-IL or TYLCV-Mld, either alone or with CLCuGB. Virus (TYLCV-IL or TYLCV-Mld) DNA was quantified with real-time PCR (qPCR) on individual plant samples collected at 18, 32 and 43 days post-inoculation (dpi) in the different treatments: TYLCV-IL (IL), TYLCV-Mld (Mld), TYLCV-IL+CLCuGB (IL+B), TYLCV-Mld+CLCuGB (Mld+B). A size-relative calibrated value (Cvr) calculated according to the fluorescence emitted by the amplification products and the size of the amplicons reflects virus accumulation. Within the boxes, the horizontal line indicates the median value (50% quantile), the box itself delimits the 25% and 75% quantiles, and the vertical lines represent the normal range of the values; the points above and/or below correspond to outlying values. The red and orange boxes correspond to the treatments with TYLCV-IL genome, and the blue and violet boxes to the treatments with TYLCV-Mld genome. Boxplots with different letters indicate significant differences between samples at each date of sampling (Tukey's test, $p=0.05$)

DNA accumulation of TYLCV-IL, TYLCV-Mld and CLCuGB was estimated by qPCR from *D. stramonium* samples collected at 18 and 25 dpi. Viral DNA accumulation was 5-12 times lower in Mld +B than in Mld-infected plants (Fig. 3, Table 3) and the difference was significant ($p=0.0034$ at 18 dpi and $p=0.0045$ at 25 dpi). Conversely, TYLCV-IL DNA accumulation was either slightly higher in IL- than in IL+B-infected plants (1.3×10^{-3} vs 0.93×10^{-3} ; $p = 0.040$ at 18 dpi) or similar in both treatments at 25 dpi (0.57 to 2.1×10^{-3} , $p=0.2416$, Fig. 3, Table 3).

DNA accumulation of CLCuGB was similar in IL+B and Mld+B-infected plants ($5-7 \times 10^{-3}$ at 18 dpi and approximately 4×10^{-3} at 25 dpi).

DISCUSSION

The major objective of this study was to compare the impact of a betasatellite (CLCuGB) on viral DNA accumulation of representatives of the IL and Mld strains of TYLCV. Whereas CLCuGB was shown previously to be transreplicated by the IL strain [15], we show here for the first time that it can also be transreplicated by the Mld strain, and at a similar level as with IL. Consistent with previous reports, the symptoms of plants co-infected with TYLCV and the betasatellite were more severe than those of plants infected with TYLCV alone irrespective of viral strain or host species (tomato or *D. stramonium*). However, contrasting results were obtained between the IL and Mld strains regarding viral DNA accumulation with or without the betasatellite. Thus, DNA accumulation of TYLCV-IL monitored in plants co-infected with IL+B was similar or higher than that of plants infected with IL alone, irrespective of host species, tomato or *D. stramonium*. On the contrary, DNA accumulation of TYLCV-Mld monitored in plants co-infected with Mld+B was always significantly lower than that of plants infected with Mld alone, irrespective of host species. Two more independent experiments comparing Mld DNA accumulation in Mld- and Mld+B-infected tomato plants confirmed the significant negative impact of the betasatellite on TYLCV-Mld (data not shown). Thus, the negative impact of a betasatellite on Mld DNA accumulation, which had been suggested from Southern blot data published previously by Ueda and collaborators with the Asian betasatellite AYVB [39], was confirmed here with the African betasatellite CLCuGB. This is probably the first report of a differential effect of a betasatellite on DNA accumulation of its helper virus and, most importantly, the impact was negative.

Table 2 Mean DNA accumulations of IL and Mld strains of TYLCV monitored at different stages of infection in tomato plants co-infected or not with CLCuGB

Dpi (1)	TYLCV-IL	TYLCV-IL +CLCuGB	ANOVA (2)	TYLCV-Mld	TYLCV-Mld +CLCuGB	ANOVA (2)
18 dpi	0.6	0.6	Df=1 F value=0.0051 P value=0.94	1.6	1.1	Df=1 F value=5.54 P value=0.027
32 dpi	0.8	1.3	Df=1 F value=12.71 P value=0.001	2.4	0.8	Df=1 F value=89.98 P value=2.05x10 ⁻⁹
43 dpi	0.8	0.7	Df=1 F value=0.46 P value=0.50	2.5	0.7	Df=1 F value=113.49 P value=1.41x10 ⁻¹⁰

Mean DNA accumulation is the size-relative calibrated fluorescence value (CVr) x 10³.

(1) dpi: days post inoculation

(2) ANOVA comparing virus DNA accumulation in TYLCV and TYLCV+CLCuGB treatments.

Two distinct betasatellites seem to have a similar negative impact on the DNA accumulation of TYLCV-Mld: the Asian AYVB used by Ueda and collaborators [39] and the African CLCuGB tested in our study. Given the large nucleotide divergence (56%) exhibited by these betasatellites, we suspect their negative impact to be associated to a peculiarity of the Mld strain rather than to a specific and potentially common feature of the betasatellites. Moreover, the fact that a reduction in viral DNA accumulation as a result of betasatellite co-infection has virtually never been reported with other begomoviruses further points to a peculiarity of TYLCV-Mld.

The major genetic difference between the IL and Mld strains of TYLCV is a region of 600 nts, which in TYLCV-IL was inherited from a representative of an Asian begomovirus species related most closely to the betasatellite-associated begomovirus ToLCBaV [4, 20, 21]. This region, in which IL and Mld strains exhibit 25% nt divergence, comprises the 5' end of the Rep gene and the 5' end of the IR containing the iterons (Rep-IR region), both of which are key determinants of virus replication. Although data on the molecular determinants involved in virus/betasatellite interactions are presently limited, it can be expected that the high nucleotide divergence detected between IL and Mld strains in a region of critical importance, at least for virus replication, could modify virus/betasatellite interactions.

Interestingly, the parental virus from which the 600nt recombinant fragment of TYLCV-IL was derived is related most closely to begomoviruses from India—a region accounting for 44% of the worldwide diversity of betasatellites reported thus far [22]. In contrast, in the Mediterranean-Middle Eastern region where TYLCV originated [20], betasatellites are extremely rare. It is therefore tempting to speculate that the 600-nt recombined region of TYLCV-IL might have conserved some ancestral features involved in efficient virus/betasatellite interactions. The evidence of co-evolution between betasatellites and the Rep amino acid sequence of their helper viruses supports this hypothesis [42]. As betasatellite and virus genomes compete for the same virus-encoded Rep, a parameter on which co-evolution might act is optimization of this tradeoff. It is therefore possible that betasatellite-associated viruses have evolved to limit the deleterious effect of betasatellites on their accumulation. The same competition hypothesis has been proposed to explain the deleterious effect of satellites on RNA virus accumulation [32].

Unlike the IL and Mld strains of TYLCV, which were never reported with betasatellites under natural conditions, the Oman (OM) strain of TYLCV was reported with the betasatellite Tomato leaf curl betasatellite (ToLCB), and the TYLCV-related Tomato yellow

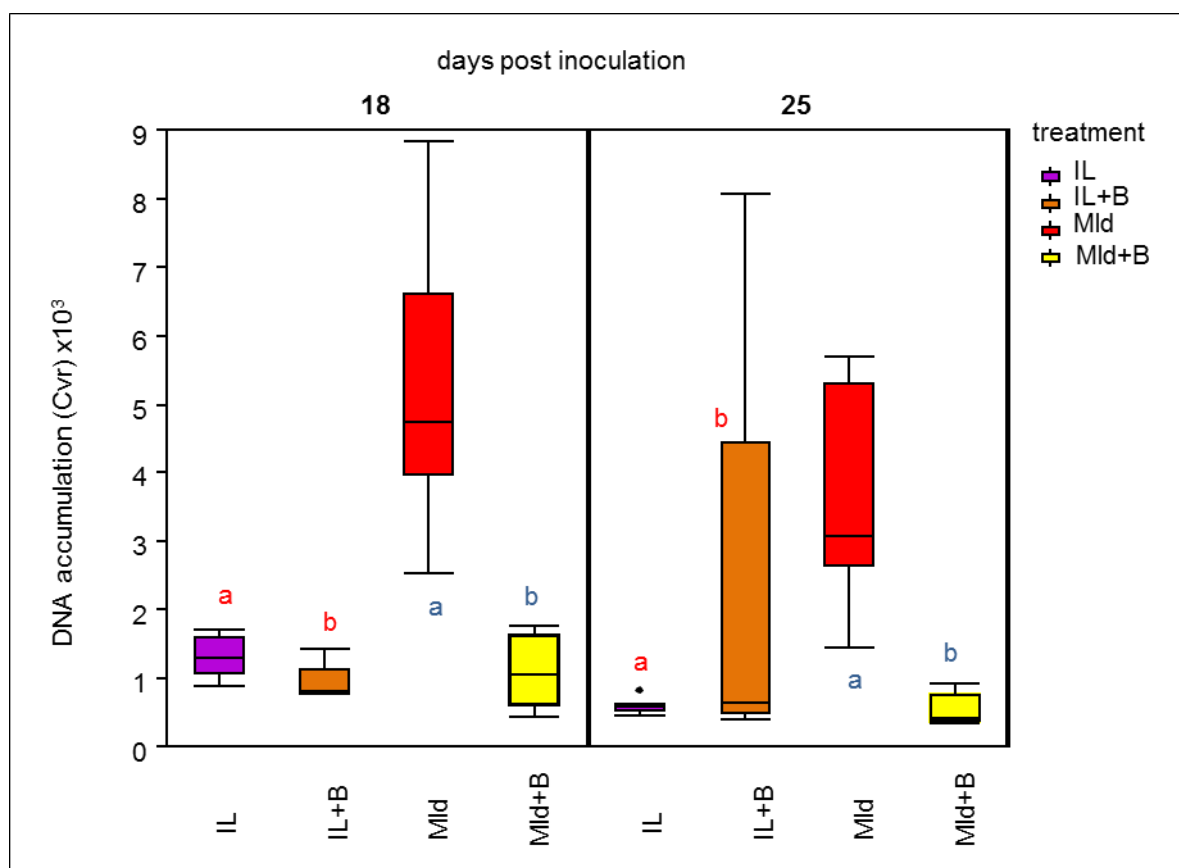


Fig. 3 Virus accumulation in *D. stramonium* plants infected with TYLCV-IL or TYLCV-Mld, either alone or with CLCuGB. DNA was quantified with real-time PCR on individual plant samples collected at 18 and 25 days post-inoculation. DNA accumulation and boxplots are as in Figure 2. Boxplots with different letters indicate significant differences between samples at each date of sampling (Kruskal-Wallis, $p=0.05$)

Table 3 Mean DNA accumulations of IL and Mld strains of TYLCV monitored at different stages of infection in *Datura stramonium* plants co-infected or not with CLCuGB

Dpi (1)	TYLCV-IL	TYLCV-IL +CLCuGB	Kruskal-Wallis rank sum test (2)	TYLCV-Mld	TYLCV-Mld +CLCuGB	Kruskal-Wallis rank sum test (2)
18 dpi	1.31	0.9	Df=1 $\chi^2=4.2$ P value=0.040	5.23	1.11	Df=1 $\chi^2=8.57$ P value=0.00342
25 dpi	0.573	2.1	Df=1 $\chi^2=1.37$ P value=0.24	3.67	0.54	Df=1 $\chi^2=8.07$ P value=0.0045

Mean DNA accumulation is the size-relative calibrated fluorescence value (Cvr)x10³.

(1) dpi: days post inoculation

(2) Kruskal-Wallis rank sum test comparing virus DNA accumulation in TYLCV and TYLCV+CLCuGB treatments.

leaf curl Mali virus (TYLCMLV) was reported with CLCuGB. Like TYLCV-IL, TYLCV-OM and TYLCMLV were both reported to be TYLCV-Mld-derived recombinants in which the Rep-IR region was inherited from parental viruses related most closely to betasatellite-associated begomoviruses [2, 7, 14, 20]. Thus, TYLCV-OM inherited the Rep-IR region (683 nt) from a virus related to TYLCV-IR from Iran, which itself inherited it from a virus related to ToLCBaV [2, 14], while TYLCMLV inherited the Rep-IR region from a virus related closely to Hollyhock crumple virus—a malvaceous betasatellite-bearing begomovirus from Egypt [7]. Although TYLCV-IL has not been reported with a betasatellite under natural conditions, its potential to interact with betasatellites is apparently similar to that of betasatellite-associated TYLC or TYLC-like viruses. Indeed, like the DNA accumulation of TYLCV-OM and TYLCMLV, which apparently remained similar or increased when associated with a betasatellite [7, 12], the DNA accumulation of TYLCV-IL was unaffected by betasatellites (our results and those of Kon [15]). These results reinforce the hypothesis that the recombined region inherited from a potential betasatellite-associated begomovirus may protect the recombinant genome from the deleterious effect of that betasatellite. The cognate Rep-IR region of TYLCV-Mld, which is at least 25% nt divergent from the recombinant region, does not seem to confer such a benefit to its genome when associated with a betasatellite.

TYLCV-IL was previously shown to transreplicate a representative of this satellite [15]. Kon and colleagues observed that viral DNA accumulation in tomato plants coinfecting with IL and CLCuGB was three times higher than in plants infected with IL alone, whereas it was fairly similar in both host plants in our study. Differences between TYLCV-IL clones and/or CLCuGB clones may explain these differences. Although both CLCuGB clones were isolated from okra, the Burkina Faso clone used in this study exhibited only 95.6% nucleotide identity with the Malian clone used by Kon and collaborators. Among the 59 nucleotide positions differing between these CLCuGB clones, more than half were detected between the A-rich region and the SCR (satellite conserved region)—a region containing the presumptive iteron-like sequences [36]. It is therefore possible that the CLCuGB from Mali was pre-adapted to establish efficient interactions with tomato begomoviruses. Although the TYLCV-IL clones used in both studies (TYLCV-IL[RE:Re4:04] and TYLCV-IL[DO,94]) exhibit only 1.6% nt divergence, it cannot be excluded that some of the discriminating nucleotides could have contributed to the differing TYLCV-IL/CLCuGB interactions. Taken together our results suggest that TYLCV-Mld, which originates from regions where betasatellites are extremely

rare, is less adapted to efficient interaction with betasatellites than viruses originating from regions where begomovirus/betasatellite coinfection is frequent or viruses that have acquired the Rep-IR genomic region of such viruses via recombination. Further studies are needed to characterize more accurately the viral determinants involved in replication competition with betasatellites.

Acknowledgments: The authors are grateful to Jean-Luc Macia and Sophie Leblaye for their excellent technical assistance in growing and sampling the plants, and to Gautier Semences (Eyrargues, France) for the production and kind supply of the “Monalbo” tomato seeds.

Conflict of Interest:

The authors declare that they have no conflict of interest.

Table S1: Number of plant samples collected and analyzed in qPCR

	Tomato			<i>Datura stramonium</i>	
Days post inoculation	18	32	43	18	32
TYLCV-MId	14	13	14	8	8
TYLCV-MId+CLCuGB	12	12	12	5	5
TYLCV-IL	14	14	14	8	8
TYLCV-IL+CLCuGB	19	19	19	5	5

References

1. Amin I, Hussain K, Akbergenov R, Yadav JS, Qazi J, Mansoor S, Hohn T, Fauquet CM, Briddon RW (2011) Suppressors of RNA Silencing Encoded by the Components of the Cotton Leaf Curl Begomovirus-BetaSatellite Complex. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24:973-983
2. Bananej K, Kheyr-Pour A, Hosseini Salekdeh G, Ahoonmanesh A (2004) Complete nucleotide sequence of Iranian tomato yellow leaf curl virus isolate: further evidence for natural recombination amongst begomoviruses. *Archives of Virology* 149:1435-1443
3. Briddon RW, Stanley J (2006) Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology* 344:198-210
4. Brown J, Zerbini FM, Navas-Castillo J, Moriones E, Ramos-Sobrinho R, Silva JF, Fiallo-Olivé E, Briddon R, Hernández-Zepeda C, Idris A, Malathi VG, Martin D, Rivera-Bustamante R, Ueda S, Varsani A (2015) Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology* 160:1593-1619
5. Chatterji A, Padidam M, Beachy RN, Fauquet CM (1999) Identification of replication specificity determinants in two strains of tomato leaf curl virus from New Delhi. *Journal of Virology* 73:5481-5489
6. Chatterji A, Chatterji U, Beachy RN, Fauquet CM (2000) Sequence parameters that determine specificity of binding of the replication-associated protein to its cognate site in two strains of tomato leaf curl virus-New Delhi. *Virology* 273:341-350
7. Chen L-F, Rojas M, Kon T, Gamby K, Xoconostle-Cazares B, Gilbertson RL (2009) A severe symptom phenotype in tomato in Mali is caused by a reassortant between a novel recombinant begomovirus (Tomato yellow leaf curl Mali virus) and a betasatellite. *Molecular Plant Pathology* 10:415-430
8. Delatte H, Martin DP, Naze F, Goldbach R, Reynaud B, Peterschmitt M, Lett JM (2005) South West Indian Ocean islands tomato begomovirus populations represent a new major monopartite begomovirus group. *Journal of General Virology* 86:1533-1542
9. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Reporter* 1:19-21
10. Fontes EP, Eagle PA, Sipe PS, Luckow VA, Hanley-Bowdoin L (1994) Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *The Journal of Biological Chemistry* 269:8459-8465
11. Idris AM, Briddon RW, Bull SE, Brown JK (2005) Cotton leaf curl Gezira virus-satellite DNAs represent a divergent, geographically isolated Nile Basin lineage: predictive identification of a satDNA REP-binding motif. *Virus Res* 109:19-32
12. Idris AM, Shahid MS, Briddon RW, Khan AJ, Zhu JK, Brown JK (2011) An unusual alphasatellite associated with monopartite begomoviruses attenuates symptoms and reduces betasatellite accumulation. *Journal of General Virology* 92:706-717

13. Jyothsna P, Haq QMI, Singh P, Sumiya KV, Praveen S, Rawat R, Briddon R, Malathi VG (2013) Infection of tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV), a bipartite begomovirus with betasatellites, results in enhanced level of helper virus components and antagonistic interaction between DNA B and betasatellites. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:5457-5471
14. Khan AJ, Idris AM, Al-Saady NA, Al-Mahraki MS, Al-Subhi AM, Brown JK (2008) A divergent isolate of tomato yellow leaf curl virus from Oman with an associated DNA beta satellite: an evolutionary link between Asian and the Middle Eastern virus-satellite complexes. *Virus Genes* 36:169-176
15. Kon T, Rojas MR, Abdourhamane IK, Gilbertson RL (2009) Roles and interactions of begomoviruses and satellite DNAs associated with okra leaf curl disease in Mali, West Africa. *Journal of General Virology* 90:1001-1013
16. Kon T, Gilbertson RL (2012) Two genetically related begomoviruses causing tomato leaf curl disease in Togo and Nigeria differ in virulence and host range but do not require a betasatellite for induction of disease symptoms. *Archives of Virology* 157:107-120
17. Kumar J, Gunapati S, Singh S, Kumar A, Lalit A, Sharma N, Puranik R, Tuli R (2013) A new betasatellite associated with cotton leaf curl Burewala virus infecting tomato in India: influence on symptoms and viral accumulation. *Archives of Virology* 158:1349-1353
18. Kumar J, Gunapati S, Alok A, Lalit A, Gadre R, Sharma N, Roy J, Singh S (2015) Cotton leaf curl Burewala virus with intact or mutant transcriptional activator proteins: complexity of cotton leaf curl disease. *Archives of Virology* 160:1219-1228
19. Laufs J, Traut W, Heyraud F, Matzeit V, Rogers SG, Schell J, Gronenborn B (1995) In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:3879-3883
20. Lefeuvre P, Martin DP, Harkins G, Lemey P, Gray AJA, Meredith S, Lakay F, Monjane A, Lett J-M, Varsani A, Heydarnejad J (2010) The Spread of Tomato Yellow Leaf Curl Virus from the Middle East to the World. *PLoS Pathog* 6:e1001164
21. Navas-Castillo J, Sanchez-Campos S, Noris E, Louro D, Accotto GP, Moriones E (2000) Natural recombination between Tomato yellow leaf curl virus-Is and Tomato leaf curl virus. *Journal of General Virology* 81:2797-2801
22. Nawaz-ul-Rehman MS, Fauquet CM (2009) Evolution of geminiviruses and their satellites. *FEBS Letters* 583:1825-1832
23. Nawaz-ul-Rehman MS, Mansoor S, Briddon RW, Fauquet CM (2009) Maintenance of an Old World Betasatellite by a New World Helper Begomovirus and Possible Rapid Adaptation of the Betasatellite. *Journal of Virology* 83:9347-9355

24. Nawaz-ul-Rehman MS, Briddon RW, Fauquet CM (2012) A melting pot of old world begomoviruses and their satellites infecting a collection of *Gossypium* species in Pakistan. *Plos One* 7:e40050
25. Patil BL, Fauquet CM (2010) Differential interaction between cassava mosaic geminiviruses and geminivirus satellites. *Journal of General Virology* 91:1871-1882
26. Péréfarres F, Hoareau M, Chiroleu F, Reynaud B, Dintinger J, Lett J-M (2011) A novel synthetic quantification standard including virus and internal report targets: application for the detection and quantification of emerging begomoviruses on tomato. *Virology Journal* 8:389-389
27. Péréfarres F, Thébaud G, Lefeuvre P, Chiroleu F, Rimbaud L, Hoareau M, Reynaud B, Lett J-M (2014) Frequency-dependent assistance as a way out of competitive exclusion between two strains of an emerging virus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281
28. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29
29. Qazi J, Amin I, Mansoor S, Iqbal MJ, Briddon RW (2007) Contribution of the satellite encoded gene beta C1 to cotton leaf curl disease symptoms. *Virus Res* 128:135-139
30. R_Development_Core_Team (2010) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
31. Ranjan P, Singh A, Kumar RV, Basu S, Chakraborty S (2014) Host-specific adaptation of diverse betasatellites associated with distinct Indian tomato-infecting begomoviruses. *Virus Genes* 48:334-342
32. Roossinck MJ, Sleat D, Palukaitis P (1992) Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. *Microbiol Rev* 56:265-279
33. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB, Moorman AFM (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research* 37
34. Saeed M, Zafar Y, Randles JW, Rezaian MA (2007) A monopartite begomovirus-associated DNA beta satellite substitutes for the DNA B of a bipartite begomovirus to permit systemic infection. *Journal of General Virology* 88:2881-2889
35. Saunders K, Bedford ID, Briddon RW, Markham PG, Wong SM, Stanley J (2000) A unique virus complex causes *Ageratum* yellow vein disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:6890-6895
36. Saunders K, Briddon RW, Stanley J (2008) Replication promiscuity of DNA-beta satellites associated with monopartite begomoviruses; deletion mutagenesis of the *Ageratum* yellow vein virus DNA-beta satellite localizes sequences involved in replication. *Journal of General Virology* 89:3165-3172

37. Tiendrébéogo F, Lefeuvre P, Hoareau M, Villemot J, Konaté G, Traoré AS, Barro N, Traoré VS, Reynaud B, Traoré O (2010) Molecular diversity of Cotton leaf curl Gezira virus isolates and their satellite DNAs associated with okra leaf curl disease in Burkina Faso. *Virol J* 7:48
38. Tiwari N, Padmalatha KV, Singh VB, Haq QMI, Malathi VG (2010) Tomato leaf curl Bangalore virus (ToLCBV): infectivity and enhanced pathogenicity with diverse betasatellites. *Archives of Virology* 155:1343-1347
39. Ueda S, Onuki M, Yamashita M, Yamato Y (2012) Pathogenicity and insect transmission of a begomovirus complex between tomato yellow leaf curl virus and Ageratum yellow vein betasatellite. *Virus Genes* 44:338-344
40. Vuillaume F, Thébaud G, Urbino C, Forfert N, Granier M, Froissart R, Blanc S, Peterschmitt M (2011) Distribution of the Phenotypic Effects of Random Homologous Recombination between Two Virus Species. *PLoS Pathog* 7:e1002028
41. Zhang H, Gong H, Zhou X (2009) Molecular characterization and pathogenicity of tomato yellow leaf curl virus in China. *Virus Genes* 39:249-255
42. Zhou X, Xie Y, Tao X, Zhang Z, Li Z, Fauquet CM (2003) Characterization of DNA β associated with begomoviruses in China and evidence for co-evolution with their cognate viral DNA-A. *Journal of General Virology* 84:237-247
43. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* 32

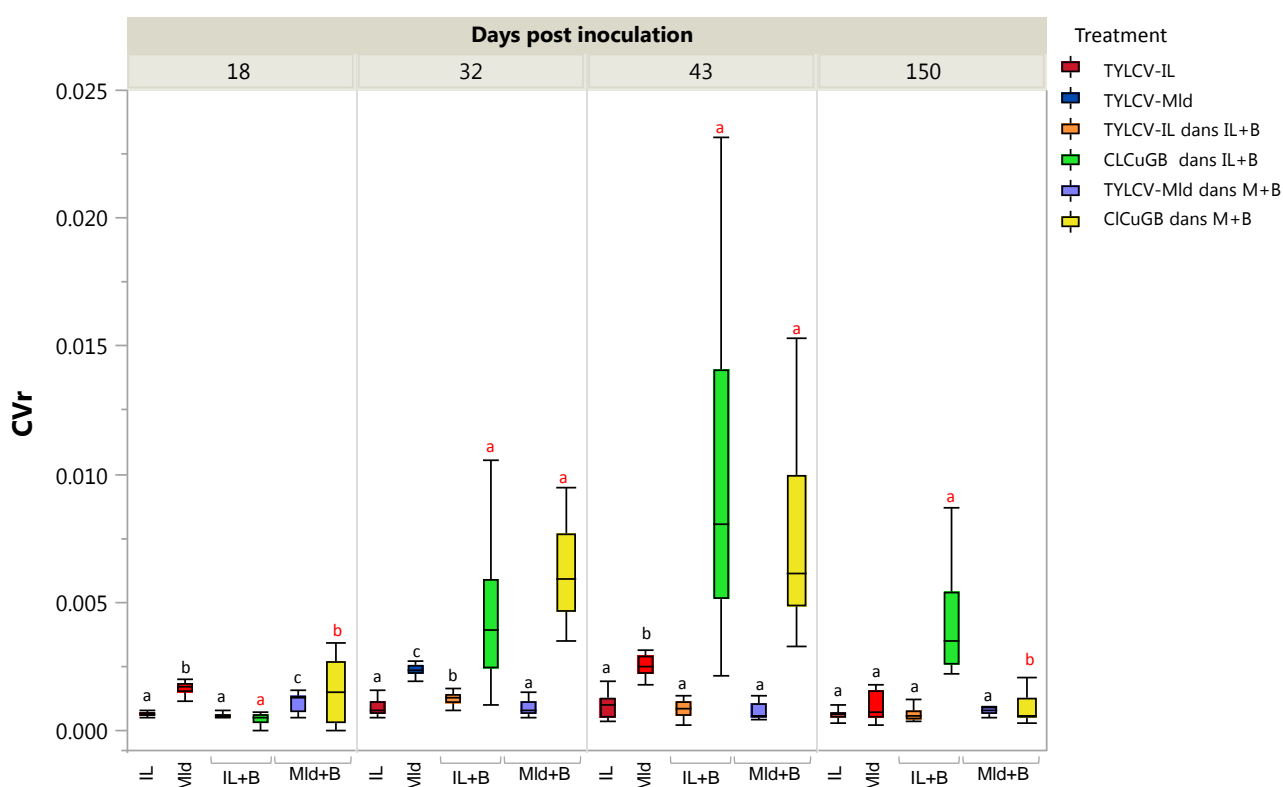


Figure 22: Dynamique d'accumulation des ADN de TYLCV-IL, TYLCV-Mld et de CLCuGB entre 18 et 150 jours post inoculation (dpi) dans des plantes de tomates infectées par TYLCV-IL (IL), TYLCV-Mld (Mld), TYLCV-IL + CLCuGB (IL+B) et TYLCV-Mld + CLCuGB (M+B). Les ADN du virus et du betasatellite ont été quantifiés par qPCR et les mêmes amorces ont été utilisées pour quantifier les deux souches virales. La structure des boxplots est décrite sur la figure 3 de l'article. Les lettres noires différentes indiquent des différences significatives entre les accumulations de TYLCV entre les traitements et les lettres rouges différentes indiquent des différences significatives entre les accumulations de CLCuGB entre les traitements (test de Tukey, , $p=0,05$).

3. Comparaison des dynamiques d'accumulation du TYLCV-Mld, du TYLCV-IL et du CLCuGB dans la tomate entre 18 et 150 dpi.

Pour une comparaison plus complète des interactions virus/betasellite entre les souches IL et Mld du TYLCV, nous présentons dans cette dernière partie du chapitre une dynamique des accumulations des deux souches virales et du CLCuGB entre 18 et 150 dpi. Les plantes analysées sont celles qui ont servi, d'une part à la description des dynamiques du TYLCV Mld et du CLCuGB dans l'article du Chapitre I (Expérience 3), et d'autre part à la comparaison des deux souches de TYLCV en présence de CLCuGB dans l'article de ce chapitre.

Les plantes testées sont infectées par TYLCV-Mld, TYLCV-IL, TYLCV-Mld+CLCuGB (M+B) ou TYLCV-IL+CLCuGB (IL+B). Le nombre d'extraits de plantes analysés est donné dans le tableau S1 de l'article précédent.

Nous avons déjà montré dans l'article que le profil d'accumulation des deux souches en l'absence de satellite était différent sur la période 18-43 dpi avec une augmentation pour Mld et un niveau stable pour IL. Nous voyons ici que les deux profils se rejoignent à 150 dpi avec un niveau d'accumulation équivalent du virus pour les deux souches (Figure 22). Il est intéressant de noter qu'en présence du betasatellite l'accumulation est stable et similaire à toutes les dates y compris à 150 dpi.

Les profils d'accumulation du CLCuGB avec les deux souches virales sont similaires entre 18 et 150 dpi et les niveaux d'accumulation sont les mêmes à 43 dpi (Figure 22). Ce qui est remarquable c'est que à 150 dpi la fréquence relative CLCuGB/virus est nettement plus forte pour la souche IL que pour la souche Mld qui présente une fréquence équivalente à celle du satellite (Tableau 9). On peut donc supposer que la région recombinante Rep-IR du génome IL, qui différencie ces deux souches virales, pourrait non seulement protéger la souche IL des effets délétères du CLCuGB entre 18 et 43 dpi, mais aussi permettre au CLCuGB de se maintenir à un niveau plus élevé dans les plantes à 150 dpi. Sur la base de ces résultats, le maintien de l'association TYLCV-IL/betasatellite dans l'environnement serait possible et peut être même meilleur que celui impliquant la souche Mld. Il faudra cependant compléter cette étude en comparant les efficacités de transmission des deux souches en présence de betasatellite.

Tableau 9: Accumulation des ADN de TYLCV-IL, TYLCV-Mld et du CLCuGB dans les plantes inoculées par TYLCV IL, TYLCV-Mld, TYLCV-Mld +CLCuGB (Mld+B) et TYLCV-IL +CLCuGB (IL+B) entre 18 et 150 dpi. Les valeurs de Cvr sont données sous la forme $Cvr \times 10^4$.

dpi	TYLCV-IL	CLCuGB (IL+B)	TYLCV-Mld	CLCuGB (Mld+B)	CLCuGB/IL	CLCuGB/Mld
18	6	3	11	8	0.50	0.73
32	13	37	8	59	2.85	7.38
43	7	79	7	64	11.29	9.14
150	6	37	8	7	6.17	0.88

4. Conclusion

Cette étude démontre que l'impact d'un betasatellite sur l'accumulation d'un virus peut être différent entre deux souches virales. De plus, cette comparaison de deux souches virales confirme la nécessité d'étudier des dynamiques plutôt que des accumulations à des points de temps uniques, tant pour le virus que pour les satellites, pour mieux prédire les risques encourus par l'association. Enfin, sur la base des résultats présentés dans ce chapitre, nous avons proposé que la région Rep-IR pourrait jouer un rôle important sur le niveau de réplication virale en présence de satellite

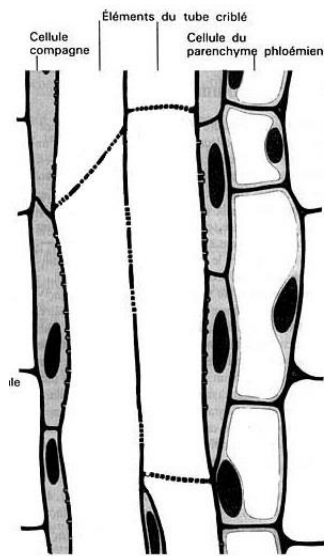


Figure 23 : Schéma représentatif d'une coupe longitudinale des éléments du phloème (source internet).

CHAPITRE III: LOCALISATION CELLULAIRE DU TYLCV-MLD, DES SATELLITES BETA ET ALPHA PAR LA METHODE D'HYBRIDATION *IN SITU* EN FLUORESCENCE (FISH)

1. Introduction

Les virus sont des parasites obligatoires qui ont besoin d'un environnement cellulaire pour effectuer leur cycle de réplication. Comme les satellites dépendent du virus assistant pour leur propagation, on suppose que le satellite est obligé d'occuper la même niche cellulaire que le virus. Or cela n'a jamais été confirmé par des observations *in-situ*. De plus, la fréquence avec laquelle le virus est associé avec des satellites dans les cellules infectées n'est pas non plus connue.

Le TYLCV est généralement considéré comme étant un virus limité au phloème (Cohen and Antignus, 1994; Rojas et al., 2001). Le phloème est le tissu conducteur de la sève élaborée. Il est constitué de plusieurs types cellulaires :

- Les tubes criblés, servant au transport de la sève élaborée, sont constitués de cellules allongées dont les parois transversales sont perforées. Ce sont des cellules vivantes mais qui n'ont plus de noyau.
- Les cellules compagnes sont accolées aux tubes criblés et possèdent un gros noyau, un cytoplasme et sont riches en mitochondries et en chloroplastes.
- Les cellules du parenchyme phloémien accumulent des réserves destinées à être transférées aux tubes criblés (Figure 23).

Comme pour tous les gémivirus, la réplication du génome à ADN du TYLCV, a lieu dans les noyaux des cellules infectées. Il a été montré dans le cas du TYLCV que l'ADN viral est principalement détecté dans les noyaux (Morilla et al., 2004). Après sa réplication, le TYLCV se déplace de cellule à cellule puis rentre dans les tubes criblés pour le transport à longue distance (Rojas et al., 2001). On s'attend donc à retrouver le TYLCV et très probablement les satellites dans tous les types cellulaires du phloème y compris dans les tubes criblés qui servent au déplacement à longue distance.

L'objectif de ce chapitre est donc de décrire la localisation du TYLCV et de deux satellites *in-planta*. Pour cela nous avons utilisé la technique d'hybridation *in situ* avec des amorces fluorescentes (FISH) spécifiques de chaque cible (virus et satellite) qui émettent dans des longueurs d'onde différentes. La fréquence d'association du virus avec le satellite a été estimée par comptage des cellules présentant un marquage simple ou un marquage double. Les estimations ont été faites avec un alphasatellite (CLCuGA) et un betasatellite (CLCuGB), deux satellites qui diffèrent par la nature de leur besoin d'assistance par le virus.

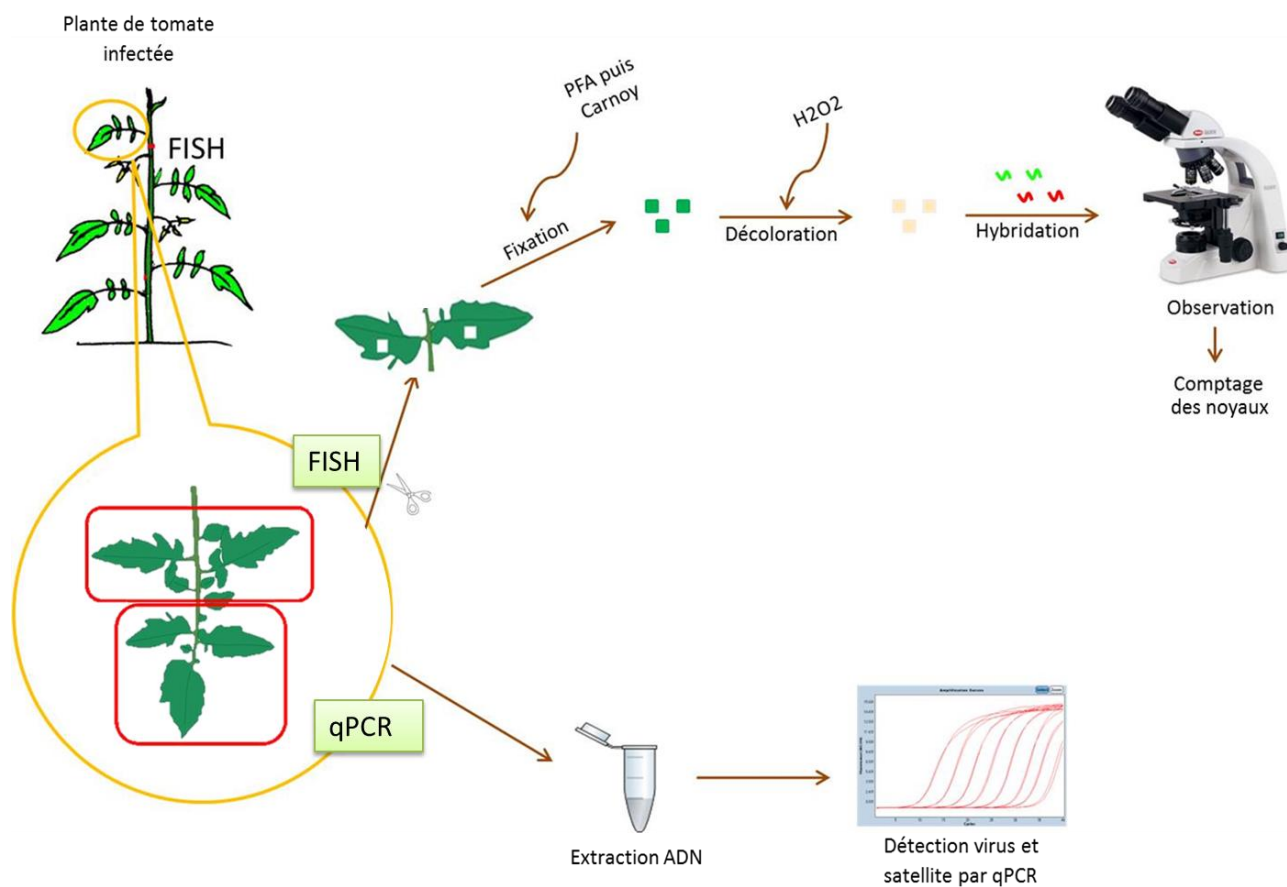


Figure 24: Les différentes étapes de préparation des échantillons pour l'étude de la localisation du TYLCV et des satellites par FISH.

Alors que l'alphasatellite ne dépend pas du virus assistant pour la réplication de son génome, le betasatellite en est entièrement dépendant. Ces deux modes de fonctionnement suggéreraient que les deux types de satellites pourraient présenter des localisations et/ou des fréquences d'association différentes.

2. Matériel et méthodes

2.1. Le matériel végétal, et les conditions d'inoculation

Par souci de cohérence, nous avons utilisé des plants de tomate de la variété Monalbo, la variété précédemment utilisée pour suivre la dynamique du virus et des satellites. Les conditions d'inoculation et de maintien des plantes utilisées dans cette expérience sont identiques à celles décrites dans les chapitres précédents. Trois plants de tomate infectés par la combinaison TYLCV-Mld + CLCuGA et trois autres par la combinaison TYLCV-Mld+CLCuGB ont été utilisés. Nous savions, grâce aux expériences de dynamique d'accumulation du virus et des satellites décrites précédemment que les ratios virus/satellite variaient au fil de l'infection : il y avait toujours plus de CLCuGB que de TYLCV dans les plantes entre 18 dpi et 32 dpi ; par contre entre 18 et 32 dpi, il y avait toujours plus de TYLCV que de CLCuGA. Nous avons donc choisi de faire les observations à ces deux dates au cours de l'infection. Les feuilles de tomate de la variété Monalbo comportent généralement 5 folioles. L'extraction des ADN totaux pour la quantification par qPCR du virus et des satellites a été faite sur 3 folioles et l'hybridation *in situ* sur les deux folioles restantes. Les différentes étapes de préparation des échantillons sont illustrées sur [Figure 24](#) et explicitées ci-dessous.

2.2. Quantification des ADN du virus et des satellites par qPCR

Trois rondelles de feuilles ont été prélevées sur 3 folioles de la plus jeune feuille ouverte de chacune des 3 plants analysées. Les extractions d'ADN total et les analyses qPCR ont été effectuées comme décrit dans les chapitres précédents. Les dosages par qPCR sont exprimés en valeur de fluorescence (N0) ramenée à un nombre comparable de cellules de plante à l'aide d'un dosage du gène de l'ARN 25S endogène.

2.3. Préparation des sondes

Les hybridations ont été effectuées avec des sondes totales du génome du TYLCV et des satellites CLCuGB et CLCuGA. Les sondes ont été synthétisées à l'aide de la polymérase Klenow à partir d'amorces hexanucléotidiques de séquence aléatoire (random priming) et avec des dUTP couplés à un fluorochrome suivant les instructions du kit BioPrime DNA labeling (Invitrogen®). Les génomes complets du TYLCV, du CLCuGA et du CLCuGB ont été isolés après restriction enzymatique de mini-préparation de plasmide recombinant et séparation sur gel d'agarose. Après dosage au nanodrop, 150 ng de chaque ADN ont été utilisés comme matrice pour le marquage selon les recommandations suivantes du

fournisseur : la solution d'amorce aléatoire (2,5X) du kit est ajoutée à l'ADN matrice, le mélange est dénaturé (10 min à 95°C, puis 15 min dans de la glace) puis additionné au mélange réactionnel contenant les désoxynucléotides (50mM dATP, 50mM dCTP, 50mM dGTP, 25mM dTTP et de 25mM dUTP-marqué) et la Klenow (40U). Le mélange est incubé toute la nuit à 37°C. Le lendemain, un tampon contenant de l'EDTA (« stop buffer ») a été ajouté au mélange réactionnel pour arrêter la réaction. Le TYLCV a été marqué par l'Alexa-568 (rouge) et les satellites par l'Alexa-488 (vert).

2.4. Préparation des tissus

Fixation

Les deux folioles de tomate n'ayant pas été utilisées pour le dosage qPCR (voir ci-dessus) ont été découpées en une dizaine de petits carrés d'environ 0,5 cm de côté, puis les carrés ont été mélangés. Le découpage a été réalisé dans une solution de para-formaldéhyde (PFA) à 4% pour fixer les tissus et la fixation des fragments découpés a été poursuivie dans ce fixateur pendant 24h sous agitation à 4°C. Les échantillons ont ensuite été incubés dans une solution de PBS 1X-glycine à 0,1 M pour éliminer l'excédent de PFA.

Décoloration

Les échantillons fixés contiennent de la chlorophylle qui, sous lumière blanche absorbe la lumière rouge dans les longueurs d'onde de 630 à 750 nm, et qui sous UV, émet un rayonnement rouge qui interfère avec les émissions lumineuses des sondes fluorescentes. La présence de cette molécule entraîne une forte autofluorescence des tissus dans le rouge ce qui entraîne des problèmes lors des observations sur le matériel hybridé avec les sonde fluorescentes. Pour remédier à ce problème d'autofluorescence des tissus végétaux, les échantillons ont été décolorés dans une solution de Carnoy (60% d'éthanol, 30% de chloroforme et 10% d'acide acétique glacial) sous agitation pendant 2h à température ambiante, puis dans une solution de peroxyde d'oxygène (H₂O₂) à 6% pendant 3h à température ambiante. Après 3 lavages dans une solution de PBS 1X, les échantillons étaient prêts pour le marquage avec les sondes fluorescentes.

Hybridation in situ

Les échantillons fixés et décolorés ont été incubés dans le tampon d'hybridation (20mM Tris-HCl pH 8,0; 0,9M NaCl ; 0,01% (p/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 30% (v/v) formamide) à raison de 3 bains successifs d'une minute chacun à température ambiante. Pour l'étape d'hybridation, les échantillons ont été incubés dans 300 µL de tampon d'hybridation contenant 10 µL de sonde. Après incubation d'une nuit à 37°C, les échantillons ont été lavés dans du tampon d'hybridation pour éliminer l'excès de sonde non fixé. Trois lavages successifs de 1 min sous agitation et à température ambiante ont été effectués.

2.5. Détection et visualisation des cibles

Huit à dix morceaux du mélange de carré provenant des 2 folioles qui ont été fixés et marqués ont été montés entre lame et lamelle dans un milieu de montage contenant du DAPI (Vectashield, Vector Laboratories Inc.). Le DAPI est une molécule qui se fixe préférentiellement sur les acides nucléiques et émet sous UV une fluorescence bleue brillante maximum à 460nm. Du fait de leur forte concentration en ADN double brin, les noyaux sont préférentiellement marqués par le DAPI. Les lames sont ensuite observées sous un microscope confocal LSM700 (ZEISS[®]) équipé de lasers qui excitent les fluorochromes à des longueurs d'onde de 405 nm, 488 nm et 555 nm. Le fluorochrome Alexa-568 a été excité avec le laser de 555 nm, et l'émission a été recueillie dans la gamme de longueurs d'onde 415-610 nm. L'Alexa-488 a été excité avec le laser LED de 488 nm, et l'émission a été recueillie dans la gamme de longueurs d'onde 415- 528 nm. Pour la collecte de la fluorescence des noyaux colorés au DAPI, le laser 405 nm a été utilisé et l'émission a été capturée dans la gamme de longueurs d'onde 415-466 nm. Les images ont été prises avec le logiciel Zen 2009 (ZEISS[®]).

2.6. Mise au point des conditions d'acquisition des images

Le TYLCV étant un virus restreint au phloème, les images ont été capturées le long des réseaux de nervures. Les photos ont été prises de façon aléatoire le long des nervures de chaque fragment de feuilles observées. Six à huit fragments de feuilles ont été examinés pour chacune des 3 plants de chaque traitement. Une vingtaine de champs de 400 mm² environ, tout fragment confondu ont été analysés en microscopie. Le nombre de noyaux analysés diffère selon les champs et les fragments observés (Annexe 3). Un seuil de positivité a été établi pour chaque fragment de feuille sur la base d'une mesure de l'autofluorescence des tissus. Ce seuil a été déterminé avec la fonction « colocalisation » du logiciel Zen 2009 (ZEISS[®]) à partir d'une zone du mésophile théoriquement dépourvue de marquage spécifique. Pour chacune des sondes, nous avons vérifié que les valeurs de fluorescence des marquages fluorescents au niveau des noyaux, supposés spécifiques, étaient supérieures au seuil de positivité.

3. Résultats

3.1. La spécificité des sondes

Des coupes obtenues à partir de plantes saines ont été incubées soit avec la solution d'hybridation ne contenant aucune sonde, soit avec la solution d'hybridation contenant les sondes ciblant le TYLCV ou les satellites. Cela nous a permis de vérifier qu'il n'y avait pas sur les tissus, de fluorescence naturelle qui émette aux mêmes longueurs d'onde que les sondes utilisées et qu'aucun signal d'hybridation aspécifique n'était détecté lors des observations au microscope à chacune des longueurs d'onde d'émission des sondes. Enfin, nous avons vérifié que les sondes ciblant les satellites ne s'hybridaient pas sur des échantillons infectés

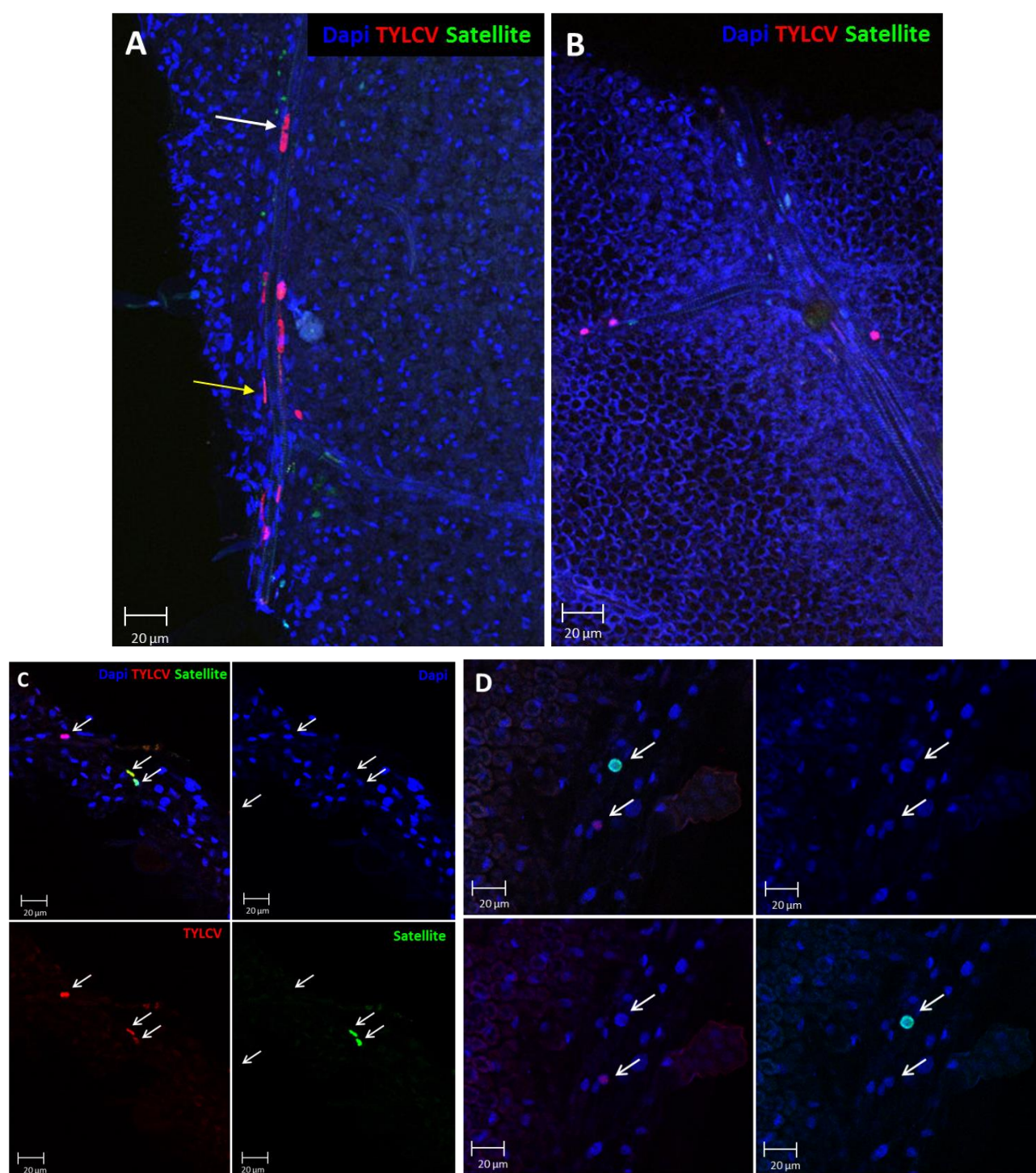


Figure 25: Localisation au microscope confocal du TYLCV et des satellites par FISH dans des tissus de plante co-infectée par le TYLCV et un satellite. **A et B :** Superposition des canaux rouge vert et bleu permettant de localiser les cellules infectées par le TYLCV (rouge), le satellite (vert) dans les éléments du tube criblé (flèche jaunes) et dans les cellules compagnes (flèche blanches). **C et D :** champs regardés avec les différents canaux : **bleu** pour les noyaux, rouge pour le TYLCV, vert pour les satellites. Le cadre supérieur gauche donne la superposition des 3 canaux (bleu+rouge+vert).

uniquement par le TYLCV. Aucun signal d'hybridation n'ayant été détecté, j'ai considéré que les sondes CLCuGA et CLCuGB étaient spécifiques pour leurs cibles respectives. La spécificité de la sonde TYLCV ne pouvait être testée directement vis-à-vis des satellites car il n'était pas possible d'avoir des tissus infectés seulement par des satellites. Nous avons donc vérifié que la sonde TYLCV, utilisée en mélange avec une sonde ciblant chacun des satellites sur des tissus de plantes co-infectées, permettait de détecter le virus seul ou associé au satellite dans certaines cellules. Ce résultat suppose que la sonde TYLCV est spécifique de sa cible.

3.2. Identification des tissus infectés par le TYLCV et les satellites

Les points fluorescents rouges sont considérés comme un marqueur de la présence du TYLCV, et les points verts comme un marqueur de la présence des satellites. Les points jaunes résultant de la combinaison de lumières rouge et verte sont considérés comme un marqueur de la présence simultanée du virus et du satellite. Les noyaux colorés au DAPI sont visualisés en bleu. Comme attendu, la fluorescence rouge émise sous UV par la sonde spécifique du TYLCV est localisée dans les éléments du tube criblé et dans les cellules qui les bordent (Figure 25A). De même, la fluorescence émise sous UV par les sondes spécifiques des satellites est également localisée dans les faisceaux des tissus conducteurs. La plupart des points de fluorescence rouge et vert colocalisent avec la fluorescence bleue qui est le marqueur des noyaux. Ceci est cohérent avec le fait que la réplication des génomes du virus et de des satellites est intranucléaire. La majorité des noyaux portant un marquage rouge ou vert sont de forme allongée et correspondent à des cellules de forme allongée (Figure 25B). De par leur forme allongée et la grosseur de leur noyau on peut les identifier comme les cellules compagnes qui bordent les tubes criblés. Les cellules compagnes présentent en effet les caractéristiques de cellules métaboliquement actives avec un gros noyau cellulaire contenant des nucléoles. On observe également des noyaux de forme ronde portant un marquage rouge ou vert dans des cellules de forme ronde que l'on suppose être des cellules du parenchyme phloémien (Figure 25A-B). De nombreux marquages longs et très fins ont aussi été observés à proximité des vaisseaux du xylème. En raison de leur forme et de l'absence de colocalisation avec le DAPI, nous avons supposé qu'il s'agissait de l'intérieur des tubes criblés du phloème. Ce dernier type de marquage n'a pas été pris en compte dans l'étude de la localisation et de la fréquence d'association des virus et satellite au niveau cellulaire. Nous avons pris soin de ne comptabiliser que les marquages rouges, verts ou jaunes qui colocalisent avec le marqueur des noyaux (Figure 25 C et D).

3.3. Mise en évidence des différents profils d'infection au niveau cellulaire

Comme attendu, nous avons détecté du marquage jaune caractéristique de noyaux co-infectés par le TYLCV et les satellites et du marquage rouge caractéristique de noyaux qui ne sont infectés que par le virus. A notre grande surprise, nous avons aussi trouvé dans une proportion non négligeable des noyaux au sein desquels seule la fluorescence verte,

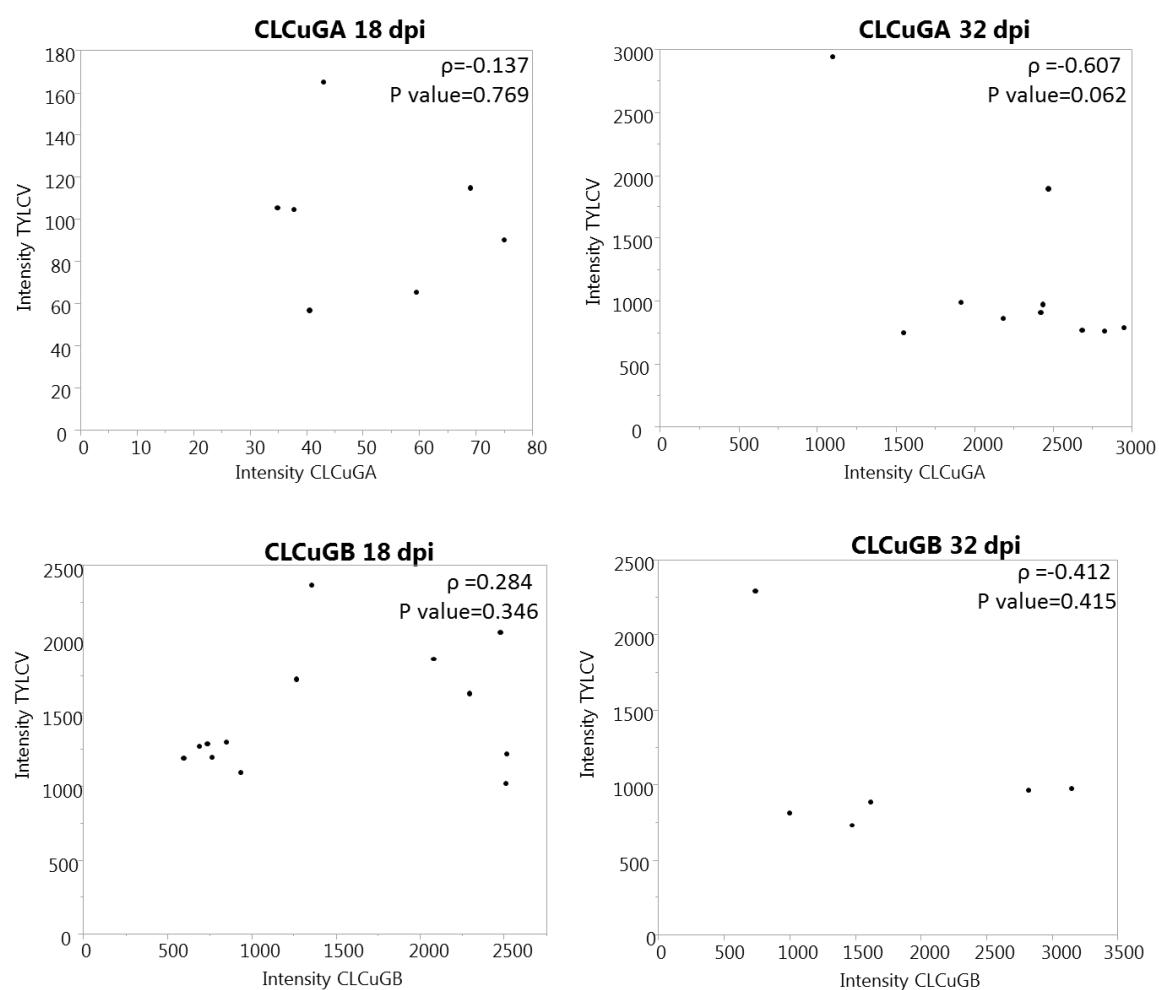


Figure 26: Relation entre l'intensité du marquage du TYLCV et des satellites dans les tissus co-infectés analysés à 18 et 32 dpi. Les corrélations ont été mesurées avec un test de corrélation de Pearson. Les valeurs de corrélation et leur significativité sont données sur le graphique pour chacune des analyses.

caractéristique des satellites a été détectée ; Cette observation a été faite pour les deux types de satellites, alpha et beta. Ce troisième type d'infection où seul le satellite serait présent dans certaines cellules est contraire au dogme du satellite qui ne pourrait être assisté qu'en co-infectant la cellule d'un virus assistant. Ce résultat est surprenant et il sera nécessaire de le confirmer par des approches complémentaires. En effet, on ne peut pas exclure que le virus soit présent dans toutes ces cellules apparemment mono-infectées par le satellite mais à une concentration tellement faible que l'on ne puisse pas le détecter. Cependant, si on suppose que le satellite puisse se trouver seul dans les cellules, on devrait observer que les quantités d'ADN du virus et du satellite soient complètement dissociées au niveau cellulaire. Nous avons testé cette hypothèse ci-dessous.

3.4. Test de la corrélation de l'intensité des marquages TYLCV et satellite au niveau cellulaire.

La découverte d'un nombre non négligeable de cellules qui ne sont positives que pour la détection du satellite (marquage vert) remet en question le mode d'assistance d'un satellite par un virus assistant. Intuitivement on s'attend à ce que l'abondance d'un ADN satellite soit positivement corrélée à l'abondance de son virus assistant. Pour tester cette hypothèse, nous avons quantifié les intensités de fluorescence rouge et verte pour des cellules co-infectées dans lesquelles les deux types de fluorescence pouvaient être détectés de manière non équivoque. Ces données d'intensité de fluorescence verte et rouge ont été analysées à chaque date, pour 6 à 13 cellules co-infectées et pour chacun des traitements TYLCV+CLCuGA et TYLCV+CLCuGB (Figure 26). Aucune corrélation n'a été détectable au seuil de 5% pour les deux traitements à deux dates différentes. On constate à la fois des cellules présentant une faible fluorescence pour le virus et une forte fluorescence pour le satellite et vice versa. Ce résultat suggère que les quantités d'ADN du virus et du satellite sont complètement dissociées au niveau cellulaire. Ceci serait cohérent avec la possibilité de trouver des cellules infectées seulement par le satellite.

3.5. Fréquence de détection des différents profils d'infection dans les cellules infectées

Plantes infectées par TYLCV+CLCuGA

Les analyses qPCR montrent que les quantités de TYLCV et d'alphasatellites sont similaires entre elles dans les plantes analysées, 18 et 32 jours après inoculation, ce qui donne un ratio TYLCV/CLCuGA proche de 1 (Figure 27). Dix-huit jours après inoculation, on observe une partition d'une moyenne de 46% de cellules co-infectées, 24% de cellules infectées par le TYLCV et 30% de cellules infectées par l'alphasatellite. Trente-deux jours après inoculation, il y a toujours autant de virus que d'alphasatellites dans les 3 plantes, cependant on constate une augmentation de la proportion de cellules co-infectées (50 à 68%), et une diminution des deux autres types d'infection. La plante 1 présente un profil d'infection particulier car la quasi-totalité des cellules sont infectées par le satellite seul (48%) ou en association avec le

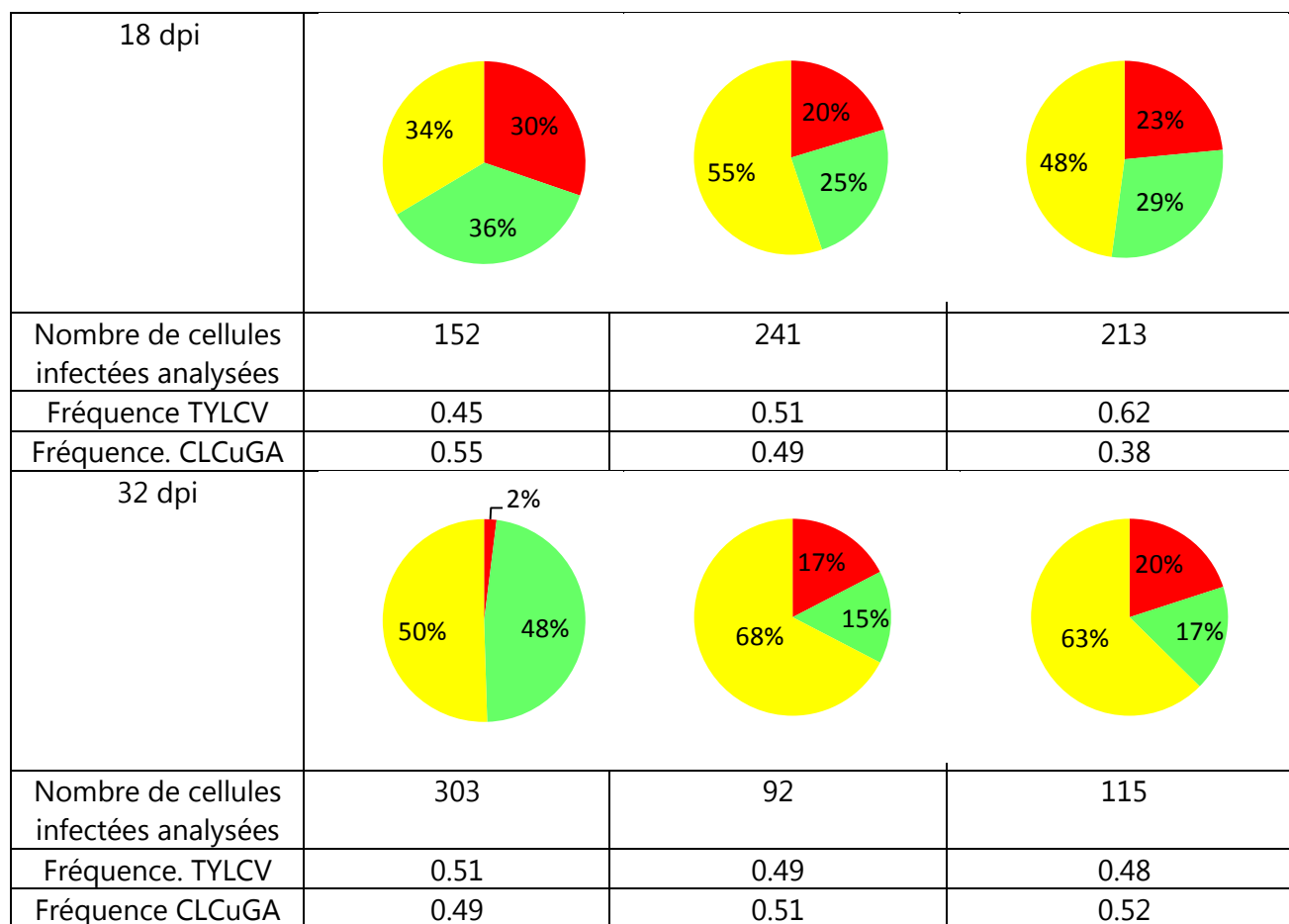


Figure 27 : Proportion de cellules infectées par le TYLCV (rouge), le CLCuGA (vert) ou les 2 (jaune) dans 3 plantes infectées par TYLCV+CLCuGA et analysées par FISH à 18 et 32 dpi. Le nombre de cellules comptées et les fréquences des ADN de TYLCV et de CLCuGA estimées par qPCR dans chaque plante sont indiqués.

TYLCV (50%). Le ratio virus/satellite détecté dans les plantes restant proche de 1 à 32 dpi, cela suggère que le ratio n'explique pas à lui seul les profils d'infection observés dans les cellules.

Plantes infectées par TYLCV + CLCuGB

L'analyse qPCR des plantes inoculées par le TYLCV et le betasatellite montre que les ADN de CLCuGB sont majoritaires dans les plantes aux deux dates (70 à 84% des ADN détectés, [Figure 28](#)). Dix-huit jours après inoculation, il y a 2,5 à 6 fois plus de betasatellites que de TYLCV dans les plantes et on observe qu'environ 80% des cellules sont co-infectées. Un à 5% des cellules sont infectées par le TYLCV seul et très curieusement, 8 à 23% sont infectées par le betasatellite seul. Trente-deux jours après inoculation, la fréquence des ADN de CLCuGB augmente légèrement dans les tissus (83-86%) et on note une légère diminution de la fréquence des cellules co-infectées par le virus et le betasatellite (70 à 75%), au bénéfice de la proportion de cellules infectées par le betasatellite seul. La proportion de cellules infectées par le TYLCV reste très faible aux deux dates.

4. Discussion

Ce travail constitue à notre connaissance la première étude visant à localiser un satellite et son virus assistant dans les tissus et à estimer leur fréquence d'association au niveau cellulaire. Notre étude a montré que les satellites et le virus étaient détectés uniquement dans les tissus phloémiens, et que les satellites étaient le plus souvent présents dans des cellules infectées par le virus. Cependant, nous avons trouvé une proportion non négligeable de cellules dans lesquelles seul le satellite était détecté.

La localisation phloémienne du TYLCV est cohérente avec les travaux de Morilla et al.(2004) qui montrent que le TYLCV est présent dans les tubes criblés, les cellules compagnes et les cellules du parenchyme phloémien. Les deux types de satellites étudiés sont également trouvés dans les mêmes tissus que le TYLCV. Cela n'est pas surprenant car, par définition, ils en dépendent pour leur réplication (dans le cas des betasatellites) et leur encapsidation. Les alphasatellites se répliquent de façon autonome dans des cellules car ils codent pour une protéine Rep qui permet, comme pour le virus, leur réplication par les protéines de plante (Saunders et al., 2000). Par contre il a été démontré que les betasatellites dépendaient entièrement de la protéine virale Rep pour leur réplication (Saunders et al., 2000). La découverte de cellules qui ne sont positives qu'avec la sonde betasatellie est donc extrêmement surprenante. De telles cellules ont été détectées avec des fréquences comprises entre 8 et 27% sur plus de 100 cellules et de façon répétée dans trois plantes et à deux dates différentes.

Cela nous amène à nous poser des questions sur la sensibilité des outils utilisés. On pourrait imaginer que le virus est présent dans ces cellules mais en quantité trop faible pour que la sonde fluorescente puisse le détecter. Ne connaissant pas la quantité minimum de virus requise pour permettre la réplication des satellites, on ne peut pas exclure que le TYLCV soit

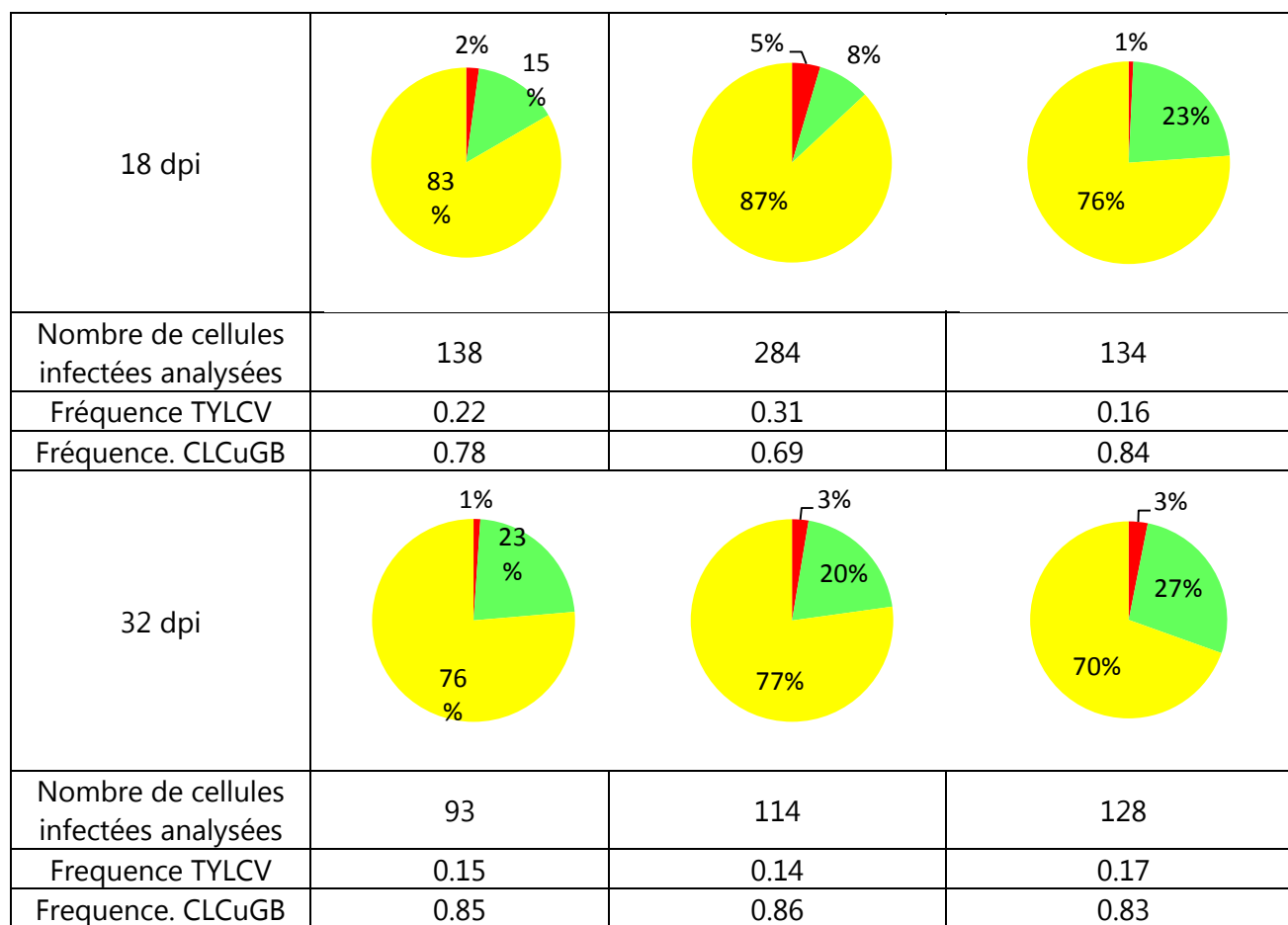


Figure 28: Proportion de cellules infectées par le TYLCV (rouge), le CLCuGB (vert) ou les 2 (jaune) dans 3 plantes infectées par TYLCV+CLCuGB et analysées par FISH à 18 et 32 dpi. Le nombre de cellules comptées et les fréquences des ADN du TYLCV et de CLCuGB estimées par qPCR dans chaque plante sont indiqués.

présent en quantité infime, inférieure au seuil de détection de la méthode. Nous n'avons pas pu vérifier cette hypothèse pendant la thèse. Cependant, nous avons montré que les quantités d'ADN du virus et du satellite détectées par la fluorescence relative des sondes au sein des cellules infectées n'étaient pas corrélées, ce qui suggère que les niveaux d'accumulation de chacun des composants virus et satellites sont relativement indépendants. Nous avons par ailleurs observé lors des études de dynamique d'accumulation (Chapitres 1 et 2) que le CLCuGB avait un effet négatif sur l'accumulation virale du TYLCV-Mld dans les plantes co-infectées, alors que ce n'était pas le cas pour la souche IL. Le fait que ces deux souches diffèrent par la région N terminale de la protéine Rep impliquée dans la reconnaissance spécifique du génome pour la réplication, nous ont conduit à émettre l'hypothèse d'une compétition pour la protéine Rep entre le CLCuGB et le TYLCV-Mld. Il est possible que cette compétition intervienne parfois de façon très forte au niveau cellulaire, limitant la réplication du TYLCV et le rendant non détectable avec nos outils.

Sachant que la réplication du betasatellite nécessite essentiellement la présence de la protéine Rep, on pourrait imaginer que des produits dérivés du gène (des ARN messagers ou la protéine) puissent être présents bien que l'ADN viral ne soit pas détecté dans la cellule. Etant donné que les sondes utilisées ciblent aussi bien le brin viral que le brin complémentaire, elles devraient détecter aussi bien les génomes viraux que les transcrits des protéines virales. Les tissus hybridés n'ayant pas été traités par une RNase, l'absence de fluorescence rouge dans certaines cellules suggère qu'elles ne contiennent ni le virus ni les ARN messagers transcrits à partir du génome viral. Ne disposant pas d'un anticorps dirigé contre la protéine Rep, nous n'avons pas pu vérifier si elle était présente ou non dans les cellules ne présentant que la fluorescence de la sonde du satellite. Cette vérification sera certainement importante pour la compréhension du fonctionnement des complexes virus/betasatellite au niveau cellulaire.

Si on admet que le betasatellite peut se répliquer dans des cellules alors que le composant viral est absent, on peut imaginer que le même phénomène existe dans le cas des virus multipartite dont le génome est séparé en plusieurs entités encapsidées séparément. C'est le cas des begomovirus à génome bipartite ou des virus de la famille des *Nanoviridae* dont le génome est composé de 6 à 8 cercles d'ADN simple brin. La fréquence d'association des composants A et B des virus bipartites n'a jamais été étudiée bien que l'on sache que seul le composant A code pour la protéine Rep. Par contre, les récents travaux de thèse d'Anne Sicard (2014) sur le fonctionnement décentralisé des virus multipartites du genre *Nanovirus* conduisent aux mêmes hypothèses que les nôtres : en marquant le segment S qui code pour la CP et le segment R qui code pour la Rep des Nanovirus, elle montre que ces deux composants du génome viral ne sont pas toujours ensemble dans les cellules, et donc que le segment viral comprenant le gène Rep ne serait pas forcément nécessaire dans la cellule pour la réplication du composant S. Ces résultats, comme les nôtres, devront être confirmés

par des tests d'immuno-marquages permettant de rechercher la présence de la protéine Rep dans les cellules où le composant codant pour cette protéine n'est pas détecté.

L'ensemble de ces résultats conduisent à proposer la possibilité que le produit d'expression du gène Rep se déplace dans les cellules voisines pour exercer ses fonctions de réplication. Cela remet en cause le dogme général qu'un virus ne peut fonctionner que si l'ensemble des composants se retrouve dans une même cellule pour l'accomplissement du cycle infectieux. Cette hypothèse est cohérente avec nos observations dans les tissus de plantes co-infectées par le TYLCV et un betasatellite.

Selon que les plantes soient infectées avec le TYLCV et l'alphasatellite ou avec le TYLCV et le betasatellite, la proportion de cellules infectées par le virus, le satellite ou par les deux est différente.

Les plantes co-infectées par TYLCV+CLCuGA présentent à 18 dpi une partition de fréquence des différents types d'infection cellulaire proche de 50/25/25 (co-infection/virus/satellite). Une telle partition peut être expliquée par à la fois une même probabilité d'entrée de chacune des particules dans la cellule et une moyenne de 2 particules qui initient l'infection. Les deux génomes étant encapsidés dans la même protéine virale (Saunders et al., 2000) on peut imaginer qu'ils ont la même probabilité d'entrer dans la cellule. La situation est différente à 32 dpi car la proportion de cellules co-infectées est plus élevée qu'à 18 dpi et les quantités d'ADN de virus et de satellite ont diminué dans la plante entre 18 et 32 dpi (Annexe 4). L'augmentation de la proportion de cellules co-infectées pourrait s'expliquer par une augmentation du nombre de particules qui entre dans la cellule à cette date. Par exemple, si 3 molécules entrent, on obtient une partition de 75/12.5/12.5. La proportion de cellules co-infectées peut aussi augmenter s'il y a plus de particules de satellite que de virus qui entrent dans la cellule.

Les cellules co-infectées par TYLCV+CLCuGB présentent une fréquence moyenne de betasatellite de 77% à 18 dpi et de 84% à 32dpi. Si nous prenons en compte la fréquence du virus et du betasatellite dans les plantes, et si, comme pour l'alphasatellite, nous considérons que la probabilité d'entrée dans la cellule est la même pour chaque composant et que 2 particules pénètrent dans chaque cellule, nous devrions observer 60% de cellules infectés par le betasatellite seul, 35% de cellules co-infectées et 5% de cellules infectées par le TYLCV seul ; Or ce n'est pas le cas. Une façon d'expliquer la partition des différents types d'infection cellulaire observée et notamment la forte proportion de cellules co-infectées serait que le nombre de particule qui pénètre dans chaque cellule soit supérieur à 2 ou que la probabilité d'entrée du betasatellite dans la cellule soit plus élevée que celle du virus. La faible fréquence de cellules infectées par le virus seul et la fréquence élevée de cellules co-infectées aux deux dates suggèrent que l'association virus-satellite est favorisée dans ces plantes. Pour interpréter les fréquences des différents types d'infection cellulaire observées, nous avons fait

des hypothèses sur le nombre de particules qui entrent dans la cellule et qui initient son infection. Ce paramètre est connu sous le nom de MOI (Multiplicity Of Infection). Plus spécifiquement, la MOI d'un virus est définie comme le nombre de génomes viraux d'une population donnée, qui participent efficacement à l'infection d'une cellule durant la colonisation d'un hôte. Etant donné que les génomes de virus et de satellites sont encapsidés dans la même capsid virale, ils ne sont pas différents à l'entrée de la cellule. Par conséquent, plus la MOI est élevée, plus les chances de co-infection cellulaire sont élevées. Une MOI supérieure à 2 permettrait d'expliquer la proportion importante de cellules co-infectées par le TYLCV et un satellite dans les tissus. La MOI est un paramètre qui n'a jamais été étudié, ni pour le TYLCV ni pour aucun autre begomovirus. Bien qu'il serait très important de la connaître pour comprendre le maintien d'un satellite avec son virus assistant, elle n'a jamais été estimée dans ce sens. Il serait intéressant de compléter notre étude de localisation cellulaire par l'estimation de la MOI du TYLCV en présence ou en l'absence de satellite pour savoir si cette MOI est naturellement élevée ou non, ou si elle est manipulée par les satellites. C'est ce point qui a été abordé durant la fin de ma thèse. Les résultats sont présentés dans le chapitre 4.

Une autre hypothèse est que les génomes de satellites soient encapsidés dans des capsides différentes de celles des génomes viraux. En effet, il a été montré pour l'African cassava mosaic virus (ACMV) que, les génomes viraux défectifs pouvaient être encapsidés dans des capsides monoïcosaédriques, contrairement aux génomes viraux qui sont encapsidés dans des doubles icosaèdres (Frischmuth et al., 2001). On peut donc imaginer que les satellites dont le génome a la même taille que celle des génomes viraux défectifs soient également encapsidés dans ces particules monoïcosaédriques. Nos résultats préliminaires effectués sur des purifications de virions à partir de plantes de *N. benthamiana* co-infectées par le TYLCV et le CLCuGB tendent à conforter cette hypothèse (Annexe 5). La MOI du satellite ne serait donc pas nécessairement la même que celle du virus même si les deux utilisent la même CP pour s'encapsider. Si la MOI du satellite était supérieure à celle du virus, elle pourrait expliquer les forts taux de co-infection cellulaire observés. C'est la raison pour laquelle il serait intéressant de calculer aussi la MOI des satellites.

Pour résumer, nous avons évalué pour la première fois la distribution cellulaire d'un begomovirus et d'un satellite. Nous avons montré que la quantité de virus et de satellite était décorrélée au niveau cellulaire aussi bien pour l'alphasatellite que le betasatellite. Enfin nous proposons sur la base de nos résultats que le betasatellite pourrait se répliquer en l'absence du génome viral dans des cellules détecté relativement fréquemment où seul le betasatellite a pu être détecté. Nos résultats et ceux de Anne Sicard sur les virus multipartites (Sicard, 2014) convergent vers l'hypothèse que les produits du gène viral Rep pourraient assurer la fonction nécessaire à l'accomplissement du cycle viral ou à la réplication du satellite sans que le génome viral soit lui-même présent dans les cellules. Ces résultats sont tout de même à prendre avec précaution. Lorsque nous déclarons que le betasatellite est seul dans certaines

cellules, la principale critique pourrait être que la sensibilité de la technique ne permet pas de détecter les trop faibles quantités de TYLCV. Des expériences complémentaires sont néanmoins nécessaires pour confirmer ces résultats. Une analyse qPCR sur protoplastes ou noyaux isolés de plantes co-infectées pourrait permettre de confirmer l'absence de génome de TYLCV dans les cellules où seul le marquage du betasatellites est présent. Mais comme le TYLCV est un virus restreint au phloème, très peu de cellules sont infectées. Morilla et al. (2004) ont estimé que dans des tissus de plantes de tomate infectés par le TYLCV ou le TYLCSV, seulement 1,4% de cellules étaient infectées. La probabilité d'obtenir un protoplasme co-infecté ou infecté par le satellite seul ou le virus seul serait donc faible.

On a vu dans cette étude qu'il y avait un fort taux de co-infection cellulaire du TYLCV avec les satellites alpha et beta, ce qui permet leur assistance et leur maintien dans la plante. Les satellites qui se retrouvent seuls dans les cellules sont théoriquement dans l'incapacité de participer à leur maintien du fait qu'ils n'ont pas accès aux fonctions nécessaires au mouvement. Cependant, si on suppose que les protéines virales peuvent être présentes dans ces cellules en l'absence du virus assistant, les conditions du maintien seraient assurées. Ces résultats semblent ainsi indiquer que les cellules ne contenant que des satellites ne sont pas nécessairement des "cellules impasses" mais qu'une sorte de "complémentation intercellulaire" pourrait exister et permettre la réplication des satellites.

CHAPITRE IV : MISE AU POINT DES OUTILS POUR LE CALCUL DE LA MOI DU TYLCV

1. Introduction

Bien que les résultats du chapitre III suggèrent que la co-infection cellulaire avec le virus ne soit pas obligatoire pour permettre la réplication du betasatellite, nous avons observé que plus de la moitié des cellules étaient coinfectées avec le virus et un satellite, que ce soit l'alphasatellite CLCuGA ou le betasatellite CLCuGB. Ce taux de co-infection dépend non seulement de la fréquence de particules de virus et de satellites présentes dans l'environnement cellulaire mais aussi du nombre de particules qui entrent dans une cellule pour participer efficacement à l'infection. Nous avons vu précédemment que les fréquences observées des ADN de virus et de satellites ne permettaient pas d'expliquer seules, les fréquences élevées de cellules coinfectées à 32 dpi. Nous nous sommes donc intéressés au nombre moyen de génomes viraux qui participent efficacement à l'infection de chaque cellule individuelle durant la colonisation d'un hôte, ce qui correspond à la définition de la multiplicité d'infection (MOI). Les satellites étant supposés être encapsidés dans la capside du virus assistant, ils ne seraient pas distinguables à l'entrée de la cellule et leur condition d'entrée dans la cellule pourrait donc être assimilée à celle du virus ; par conséquent, la probabilité de co-infection des satellites avec leur virus assistant pourrait dépendre de la multiplicité d'infection (MOI) du virus assistant lui-même ; Ainsi, une forte MOI augmenterait les chances du satellite de se retrouver en présence du virus dans la même cellule alors qu'une faible MOI serait défavorable au satellite.

La MOI est un paramètre qui n'a été estimé que pour quelques virus : un phage (Turner et al., 1999), un virus d'insecte (Bull et al., 2001), des virus de vertébrés (Josefsson et al., 2011; Jung et al., 2002) et trois virus de plante (Bergua et al., 2014; Gonzalez-Jara et al., 2009; Gutiérrez et al., 2010). Ces études ont montré que le nombre moyen de génomes infectant chaque cellule varie entre 1 et 13, et qu'il pouvait varier au cours du temps (Gutiérrez et al., 2010).

Cependant, ce paramètre n'est pas connu pour le TYLCV ni pour aucun autre begomovirus. L'originalité de ce travail est que, en plus d'apporter des informations sur le maintien d'un satellite avec un virus, il présente un intérêt en recherche fondamentale pour comprendre l'histoire de vie des virus et les phénomènes liés à leur cycle biologique et à leur évolution. En effet, la MOI détermine en grande partie le potentiel d'interactions intracellulaires entre les différents variants génomiques d'une population virale. Parmi ces interactions intracellulaires, on peut citer la compétition, les échanges génétiques tels que le réassortiment et la recombinaison et la complémentation fonctionnelle.

Tableau 10: séquences des marqueurs aléatoires de 23 nt insérés dans le génome du TYLCV

	Marqueur (5' → 3')
marqueur_1	CTAGCACGGCTAACAAGGTCCTG
marqueur_2	CCCCTTAGGCAATCAGTTCGAGA
marqueur_3	CTAGGCGGCCCCGACTGGCACTCA
marqueur_4	GCTGTTGGGTTCTGGTACAAGCT

L'étude de la MOI sera basée sur l'utilisation de deux variants stables et équicompetitifs du TYLCV, qui diffèrent par des marqueurs de quelques nucléotides insérés dans le génome viral. Par variant équicompetitif, nous entendons que l'insertion des marqueurs n'induit pas de sélection en faveur d'un des variants. Il faut donc qu'en moyenne sur plusieurs répétitions de plantes infectées par ces deux variants, chacun se maintienne, et que la fréquence de l'un par rapport à l'autre reste constante au cours du temps. Les deux variants équicompetitifs devront être co-inoculés au sein des plantes puis un comptage en microscopie confocale du nombre de cellules infectées par un variant, par l'autre, ou par les deux devra être réalisé. Le nombre moyen de copies de variant TYLCV entrant par cellule sera ensuite inféré par un calcul du maximum de vraisemblance basé sur (i) la fréquence relative des deux variants mesurée par qPCR et (ii) la proportion de cellules contenant chacun des deux variants seuls ou contenant les deux. Cette approche est similaire à celle déjà développée et éprouvée au laboratoire pour le calcul de la MOI du *Cauliflower mosaic virus* (CaMV, Gutiérrez et al., 2010). La première étape indispensable pour étudier la MOI est donc d'obtenir des variants infectieux de TYLCV, puis de vérifier que ces variants sont stables et équicompetitifs.

Au cours de ma thèse, j'ai réussi à obtenir deux variants stables et équicompetitifs mais nous n'avons pas pu estimer la proportion de cellules contenant chacun des deux variants seul ou en co-infection. En effet, nous avons observé que l'affinité des sondes était différente selon le fluorochrome utilisé. Les résultats sur la fabrication des variants infectieux du TYLCV et la vérification de leur équicompetitivité sont décrits ci-dessous.

2. Matériel et méthodes

2.1. Construction des variants de TYLCV

2.1.1. Choix du marqueur

Dans le but d'obtenir deux variants différenciables, différents marqueurs de 23 nt ont été insérés dans un génome du TYLCV-Mld. Les géminivirus sont des virus dont la taille du génome est contrainte par l'encapsidation. Aussi, afin de ne pas augmenter la taille du génome du TYLCV, nous avons choisi de remplacer 23 nt du TYLCV par un marqueur de même taille que nous avons défini. Afin de maximiser les chances que les variants créés soient équicompetitifs, la région du génome remplacée par le marqueur ne doit pas avoir de fonction connue comme importante pour la valeur adaptative (« fitness ») du virus. Nous avons donc choisi la partie de la région intergénique qui se trouve en aval de la structure tige boucle du TYLCV car, elle n'est pas connue pour jouer un rôle dans la fitness du virus. Nous avons ciblé particulièrement la région située au pied de la tige boucle, car l'insertion d'un site de restriction a précédemment été effectuée dans cette région sans impact sur la fitness du virus (Urbino et al., 2008). Les marqueurs insérés ([Tableau 10](#)) sont des séquences aléatoires créées à partir de modifications de marqueurs définis par Monsion et al. (2008). Nous avons soumis ces séquences dans Blastn pour vérifier que ces marqueurs ne présentaient aucune

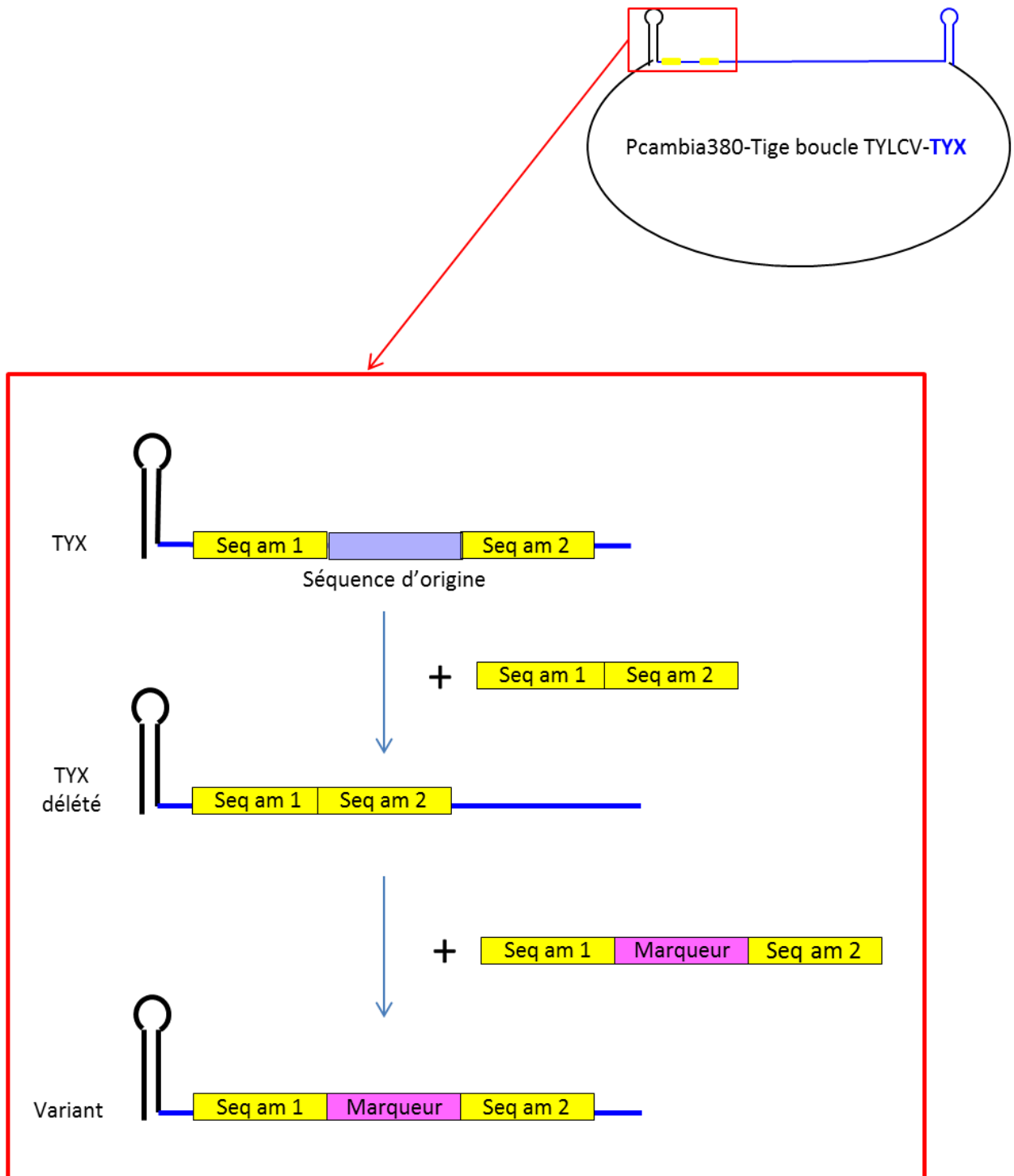


Figure 29: Obtention par mutagenèse dirigée des variants de TYLCV par insertion d'un marqueur dans une construction infectieuse (Pcambia380-Tige boucle TYLCV-TYX, Urbino et al., 2008). Les séquences utilisées pour l'amorçage sont surlignées en jaune et la position du marqueur est écrite en rose.

similarité de séquence avec le reste du génome du TYLCV, des satellites ou même de la tomate. L'équicompatibilité des variants étant un paramètre difficile à obtenir, 4 variants ont été fabriqués de manière à augmenter les chances d'obtenir 2 variants équicompatibles.

2.1.2. Mutagenèse dirigée pour l'insertion du marqueur sur le génome du TYLCV

Dans un souci de simplicité et de rapidité, une construction déjà infectieuse d'un clone de TYLCV a été utilisée pour la fabrication des variants. Ce clone (TYX) présente une mutation dans la tige boucle (le T en position 2775 est remplacé par un C) et le site de restriction XhoI a été inséré au pied de la tige boucle. Le génome entier est cloné dans un plasmide pCambia 0380 qui contient la tige boucle du TYLCV et le site XhoI (Urbino et al., 2008), donnant une construction infectieuse 1.01 du TYX (Figure 29). Le fragment à remplacer étant d'une taille assez importante (23 nt), la mutation a été effectuée en 2 étapes. Une première mutagenèse dirigée a permis de déléter 23 nt à partir de la position 36 du génome TYX. Une deuxième mutagenèse dirigée a permis d'insérer à la place le marqueur.

Les étapes de mutagenèse, de délétion et d'insertion ont été effectuées avec le kit QuikChange Lightning de chez Stratagène® (prévu pour faire de la mutagenèse dirigée) en suivant les instructions du fournisseur. L'amorce utilisée pour la délétion, correspond à la séquence des 10 nt situés en amont et des 10 nt situés en aval de la région à déléter, et mis bout à bout comme indiqué sur la Figure 29. Les amorces utilisées pour l'insertion des marqueurs correspondent à la séquence du marqueur que l'on veut insérer flanqué des 10 nt situés de part et d'autre de la région où l'on souhaite insérer le marqueur (Tableau 11). Le séquençage du clone entier muté a été effectué après délétion et après l'insertion pour vérifier que la séquence finale était conforme à l'attendu. Après vérification des séquences des clones, 3 variants ont été retenus.

2.2. Infectivité des variants

Chaque clone de variant a préalablement été transféré dans *A. tumefaciens* par électroporation et a été agroinoculé dans 5 à 10 jeunes plants de tomate (Monalbo) dans le but de tester leur infectivité. Le clone délété a également été inoculé afin de vérifier si cette région était importante pour l'infection du TYLCV. La méthode d'inoculation et les conditions de maintien des plantes sont les mêmes que celles décrites dans les chapitres 1 et 2. Trente-deux jours après inoculation les plants ont été prélevés puis testés en qPCR avec des amorces spécifiques permettant de différencier les variants (Tableau 12). Tous les prélèvements, les extractions d'ADN et les qPCRs effectués dans cette étude ont été réalisés comme décrit dans les chapitres précédents.

Tableau 11: séquences des amorces utilisées pour la mutagenèse.

Amorce pour	Nom	Séquences (5' → 3')	Taille
déletion	TYX_del-Fw	CTCGAGCTTTTATATGGTCCCTGTCAACCAATCAAATTGC	40
	TYX_del-Rev	GCAATTTGATTGGTTGACAGGGACCATATAAAAGCTCGAG	40
insertions	TYX_var1_Fw	CTCGAGCTTTTATATGGTCCCTAGCACGGCTAACAAGGTCCTGCTGTCAACCAATCAAATTGC	63
	TYX_var1_Rev	GCAATTTGATTGGTTGACAGCAGGACCTTGTTAGCCGTGCTAGGGACCATATAAAAGCTCGAG	63
	TYX_var3_Fw	CTCGAGCTTTTATATGGTCCCTAGGCGGCCCGACTGGCACTCACTGTCAACCAATCAAATTGC	63
	TYX_var3_Rev	CTCGAGCTTTTATATGGTCCGCTGTTGGGTTCTGGTACAAGCTCTGTCAACCAATCAAATTGC	63
	TYX_var4_Fw	CTCGAGCTTTTATATGGTCCGCTGTTGGGTTCTGGTACAAGCTCTGTCAACCAATCAAATTGC	63
	TYX_var4_Rev	GCAATTTGATTGGTTGACAGAGCTTGTAACAGAACCCAAACAGCGGACCATATAAAAGCTCGAG	63

Tableau 12: séquences des amorces utilisées pour la détection par qPCR des variants

Nom	Séquence (5'→3')	Taille	Tm	GC%	Longueur du produit
TYX-36-Fw	CACGAGGGTTCCACAGACGTCAC	23	58	61	270
TYX-Rev	TCACGGGCCCTTACAACAGA	20	61	55	
TYX_var_1-Fw	CTAGCACGGCTAACAAGGTCCTG	23	63	56	270
TYX_var_1-Rev	TCACGGGCCCTTACAACAGA	20	61	55	
TYX_var_3-Fw	CTAGGCGGCCCGACTGGCACTCA	23	70.	69	287
TYX_var_3-Rev	TGGTCGCTTCGACATAGTCACGGGC	25	69	60	
TYX_var_4-Fw	GCTGTTGGGTTCTGGTACAAGCT	23	63	52	270
TYX_var_4-Rev	TCACGGGCCCTTACAACAGA	20	61	55	

Tableau 13: Spécificité des amorces qPCR utilisées pour la détection des variants.

Cible Amorce	Spécificité				Efficacité des amorces
	Var-1	Var-3	Var-4	TYX	
Var-1	+	-	-	-	89%
Var-3	-	+	-	-	94%
Var-4	-	+	+	+	86%
TYX	-	-	-	+	90%

2.1. Équicompetitivité des variants

L'équicompetitivité a été étudiée entre les clones var1, var3 et TYX. Ils ont été inoculés deux à deux dans une vingtaine de plants de tomate selon les trois combinaisons suivantes : var1-var3, TYX-var1, TYX-var3. Les plants ont ensuite été prélevés à 18 et 32 dpi, puis chaque variant a été quantifié par qPCR. La spécificité des amorces définies pour la détection de chacun des marqueurs par qPCR a été déterminée sur des plants infectés par chacun des marqueurs. La fréquence des variants dans chacune des combinaisons a ensuite été mesurée.

2.2. Mise au point des sondes et observation au microscope confocal

Les deux variants équicompetitifs (var1 et var3) ont été choisis pour la mesure de la MOI. Des sondes ADN simple brin correspondant à la séquence reverse complémentaire du brin viral du marqueur, soit 23 nt, couplées en 5' à un fluorochrome Atto565 (rouge) pour le var1 et Alexa488 (vert) pour le var3 ont été commandées chez Eurogentec[®].

La spécificité des sondes a été vérifiée sur des échantillons de plantes mono-infectées par chacun des variants et prélevés à 18 dpi. Les fragments de folioles de jeunes feuilles adultes ont été fixés, décolorés et hybridés avec chacune des sondes et observés au microscope confocal comme décrit dans le chapitre III. Les échantillons de plantes co-infectées par chacune des combinaisons et prélevés à 18 dpi ont ensuite été hybridés avec les deux sondes.

3. Résultats

3.1. Mutagenèse des clones TYX

Dans une première approche, nous avons prévu de faire en une seule étape le remplacement de la région virale de 23 nt par celle du marqueur ; A priori, cela était possible d'après la notice du kit. Cette opération n'a pas fonctionné probablement par ce que la région à remplacer était trop longue. Suite à l'avis d'un technicien de Stratagène[®], nous avons opté pour une opération en deux étapes comme décrit dans le matériel et méthodes et la [Figure 29](#). Le séquençage du clone muté entier a été effectué après délétion et après l'insertion pour vérifier que la séquence finale était conforme à l'attendu.

3.2. Spécificité des amorces de détection par qPCR

L'efficacité et la spécificité des amorces utilisées pour le dosage des variants dans chaque plante par qPCR ont été vérifiées ([Tableau 13](#)). Tous les couples d'amorces ont une efficacité supérieure à 86%. Chaque couple d'amorces a été testé sur tous les variants. Les amorces de var1, var3 et TYX sont spécifiques contrairement aux amorces conçues pour la détection du var4 qui détectent aussi le var3 et le TYX.

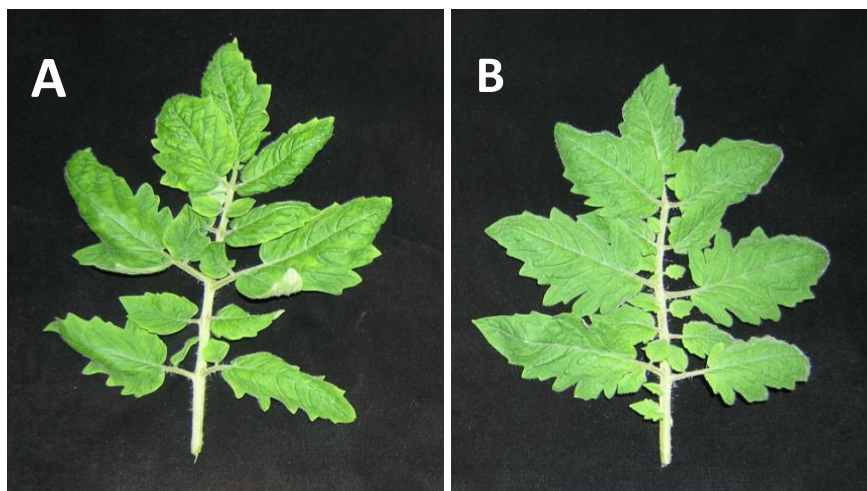


Figure 30: Symptômes observés sur une feuille de tomate de la variété Monalbo infectée par le TYX (A) ou par Var1 (B) à 32 dpi.

Tableau 14: Taux d'inoculation. Le nombre de plants infectés sur le nombre de plants inoculés (*).

TYX	4/5*	80%
TYX_del	8/9*	88%
var_1	6/9*	66%
var_3	8/10*	80 %
var_4	4/10*	40%

3.1. Infectivité des variants

Le clone TYX délété et les variants var1, var3 et var4 sont tous infectieux. Les plants de tomates présentent les mêmes symptômes quel que soit le clone agro-inoculé : un enroulement des feuilles en cuillère typique du TYLCV et un jaunissement légèrement moins prononcé que ceux causés par le TYX (Figure 30). Le clone délété qui avait été inoculé afin de vérifier l'importance de la région modifiée pour l'infection présente 88% de réussite à l'inoculation ce qui montre que la région modifiée n'est pas décisive pour l'infection. Les taux d'infection des différents variants est de 80 % pour le clone TYX et le variant Var3, 66% pour Var1, et 40% pour Var4 Tableau 14. Ce dernier variant a été éliminé car en plus d'être désavantagé par rapport aux autres variants en ce qui concerne l'infectivité de son hôte, et la spécificité des amorces qPCR.

3.2. Equicompetitivité des variants

L'équicompetitivité a été mesurée entre les var1, le var3 et le TYX dans des plants inoculés par différentes combinaisons de 2 de ces 3 clones. Leur fréquence moyenne a été calculée à 18 et 32 dpi. Les variants sont considérés comme équicompetitifs si leur fréquence est stable entre ces deux dates. La fréquence individuelle et moyenne d'un des variants est présentée à 18 et 32 dpi pour chaque couple testé (Figure 31). La variation de la fréquence moyenne des variants entre 18 et 32 dpi est plus faible dans les plantes infectées par var1 et var3 que dans les autres. Ce sont donc ces variants qui sont sélectionnés pour le calcul de la MOI du TYLCV.

3.3. Mise au point des sondes et observation au microscope confocale

Les observations des échantillons infectés avec var1 puis hybridés avec la sonde var3 et vice-versa montrent que les sondes sont spécifiques pour chacun des variants. Aucun marquage n'est observé sur les plants sains.

Les observations au microscope confocal des échantillons infectés par var1 marqué en rouge (Atto656) et var3 en vert (Alexa488) ont indiqué qu'il y avait environ 10 fois plus de cellules fluorescentes rouges que de cellules fluorescentes vertes dans les cellules infectées. Cette différence a été observée sur 3 plantes différentes. Etant donné que dans les expériences précédentes, les deux variants s'accumulaient de façon similaire, nous avons voulu vérifier si le problème venait du marquage vert de la sonde. Pour cela, nous avons commandé les mêmes sondes en inversant les couleurs des fluorochromes et nous avons commandé des fluorochromes basés sur la même molécule (Atto). Dans le deuxième jeu de sonde, var1 est donc marqué en vert (Atto488) et var3 en rouge (Atto565). Des échantillons infectés par les deux variants ont été hybridés en parallèle avec un mélange de sondes var1 (rouge) et var3 (vert), ou un mélange de sondes var1 (vert) et var3 (rouge). Dans les deux cas, le variant qui s'hybride avec la sonde rouge est détecté environ 10 fois plus que le variant qui s'hybride avec la sonde verte.

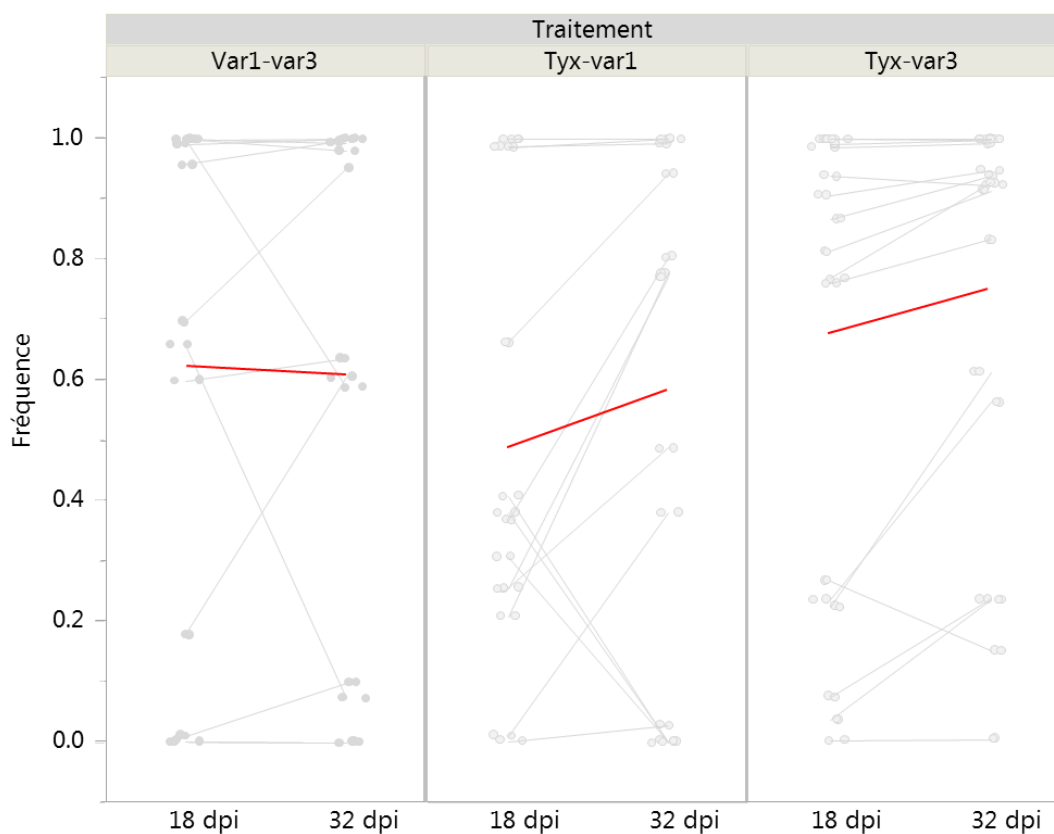


Figure 31: Fréquence des variants dans les plants de tomates pour chaque traitement à 18 et 32 dpi. La ligne rouge représente la fréquence moyenne au cours du temps.

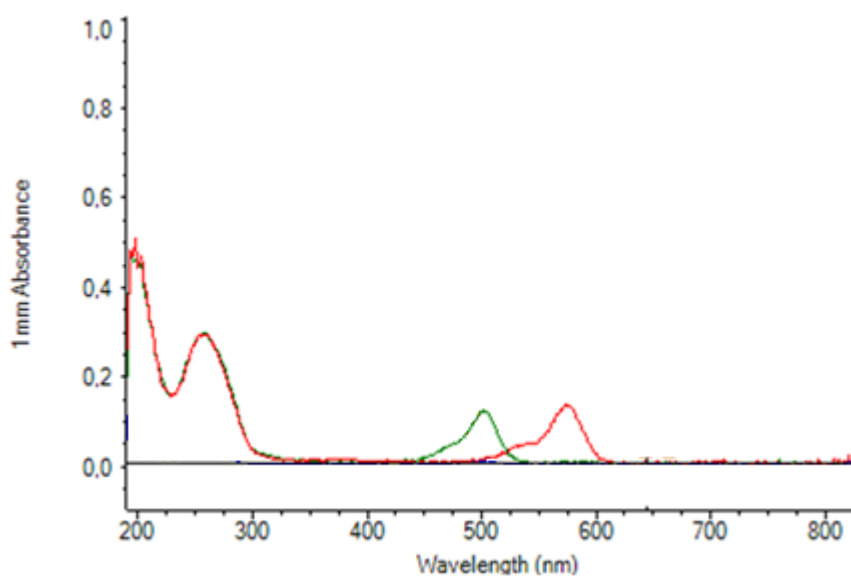


Figure 32: Spectre d'absorption des fluorochromes Alexa488 (vert) et en d'Atto565 (rouge) en fonction de la longueur d'onde d'émission.

Nous avons donc supposé que le problème venait du fluorochrome vert qui avait une intensité de fluorescence plus faible que celle du fluorochrome rouge. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré leur spectre d'absorption (Figure 32). L'intensité de fluorescence des deux fluorochromes est similaire, ce qui n'explique donc pas la différence d'intensité de fluorescence observée.

Au regard de ces résultats, nous supposons que la différence d'intensité de fluorescence observée est probablement due à une interférence entre l'ADN simple brin utilisé pour le marquage et le fluorochrome vert, ce qui entraîne une différence d'affinité des sondes pour leur cible en fonction du fluorochrome auquel elles sont couplées.

4. Discussion et perspectives

Le variant délété et les 3 variants étant infectieux, cela suppose que la région de 23 nt située juste après la tige boucle et délétée ou remplacée par un marqueur n'est pas déterminante pour la capacité d'infection du TYLCV. Les clones délétés, var1 et var3, ont un taux d'infection supérieur ou similaire à celui du TYX ; Ces résultats confirment ceux de Urbino et al. (2008) qui montrent que l'insertion d'un site de restriction dans cette région n'impact pas l'accumulation du TYLCV. Par contre, la séquence du marqueur var4 semble affecter la capacité du virus à infecter la tomate. Cela signifie qu'il pourrait y avoir des interactions soit au niveau de la construction plasmidique infectieuse, soit au niveau du génome libéré dans la plante qui affecte l'initiation de l'infection. Récemment, notre équipe a identifié au Maroc un clone recombinant de TYLCV qui aurait recombiné avec un génome de TYLCSV au niveau des 63 nt situés après la tige boucle (Belabess et al., 2015). L'important travail d'échantillonnage réalisé sur le terrain a montré que ce génome recombinant avait remplacé en quelques années les parents TYLCV et TYLCSV présents localement (Belabess et al., 2015). Ce résultat suggère que cette région du TYLCSV intégrée dans un fond génétique TYLCV pourrait conférer un avantage à ce clone recombinant dans les variétés de tomates tolérantes du Maroc. Cela ayant été démontré dans notre équipe (Communication personnelle, Belabess) on ne peut donc plus considérer que cette région ne joue aucun rôle sur la fitness du TYLCV.

Les méthodes statistiques de calcul de la MOI sont basées sur l'hypothèse d'une égale chance des deux variants marqués de pénétrer et de se répliquer au sein des cellules. Nous avons réussi à obtenir deux variants équicompetitifs de TYLCV entre 18 et 32 dpi. Cependant, lors de l'étude de la dynamique du TYLCV dans les chapitres précédents, nous avons pu observer une variation des quantités de virus au cours du temps. Une confirmation de l'équicompetitivité des variants entre 18 et 32 dpi pourrait être effectuée en mesurant la fréquence des variants à des dates intermédiaires de manière à s'assurer que la fréquence reste constante entre ces deux dates.

L'estimation par FISH de la fréquence de chaque variant seul ou en coinfection dans les cellules passe par l'utilisation de sondes fluorescentes spécifiques de chacun des marqueurs

insérés dans les variants. Les sondes utilisées correspondent au marqueur et sont donc de 23 nt, ce qui est relativement court pour une hybridation spécifique *in-situ* de la sonde fluorescente. Nous avons mis en évidence la spécificité de nos sondes pour chacun des variants testés ce qui indique que la taille de cette sonde ne pose pas de problème pour la spécificité. Des sondes de tailles similaires avaient été utilisées par Ghanim et al. (2009) et dans notre équipe pour la détection du TYLCV dans les plantes et l'insecte. Cependant, nous avons rencontré un problème lorsque les oligonucléotides ont été marqués avec des fluorochromes verts, et cela pour deux fluorochromes différents (Atto 488 et Alexa 488).

Les fluorochromes utilisés ont des caractéristiques chimiques et donc un encombrement stérique différents ; en fonction du linker le fluorochrome peut gêner l'hybridation jusqu'à deux bases sur l'oligonucléotide. Cela réduirait la taille effective de l'oligonucléotide qui s'hybride sur la cible et pourrait avoir pour conséquence de diminuer l'affinité de la sonde. L'utilisation de sondes avec un plus long linker devrait permettre d'éliminer la différence d'affinité observée.

En fonction des résultats de MOI obtenus, une étude de la MOI du TYLCV en présence des satellites pourrait être menée pour voir si ces derniers ont un impact sur la MOI du virus. A plus long terme, il serait aussi intéressant de calculer la MOI des satellites. En effet, leur génome fait la moitié de la taille du génome viral et ils pourraient comme le suggère les résultats obtenus par Frischmuth et al. (2001), être encapsidés dans des simples icosaèdres, plus petits que les doubles icosaèdres qui encapsident le génome viral. Ils pourraient alors entrer plus facilement que les génomes viraux dans les cellules, ce qui leur confèrerait une MOI différente de celle du virus.

CHAPITRE V : MISE AU POINT D'AMORCES GÉNÉRIQUES POUR LA DÉTECTION DE BETASATELLITES

1. Introduction

Le nombre d'articles décrivant des maladies causées par des complexes begomovirus/satellites (alphasatellites et betasatellites) n'a cessé de croître depuis la première description des betasatellites dans les années 2000 (Saunders et al., 2000). Contrairement aux alphasatellites qui n'ont que très peu ou pas d'effet sur les maladies causées par les begomovirus, les betasatellites peuvent augmenter la sévérité des symptômes causés par leur virus assistant et élargir leur gamme d'hôte. Les complexes begomovirus-satellites infectent diverses espèces de plantes sauvages et cultivées et peuvent être à l'origine de graves épidémies virales notamment sur des cultures tropicales et subtropicales d'importance économique telles que le coton et la tomate. Ainsi, la maladie de l'enroulement du coton peut être causée par plusieurs begomovirus, toujours en association avec un même satellite, le Cotton leaf curl Multan betasatellite (CLCuMB) (Mansoor et al., 2003). Entre 1992 et 1997, les pertes liées à ce complexe ont été estimées à 5 milliards \$ US (Mansoor et al., 1999).

Malgré la présence de begomovirus sur tous les continents (Amérique, Afrique, Europe, Asie, Océanie), les betasatellites n'ont été décrits à ce jour qu'en Afrique et en Asie (Nawaz-ul-Rehman and Fauquet, 2009). Dans la grande majorité des cas, ces betasatellites ont été isolés en présence de begomovirus monopartites à l'exception de quelques rares cas comme celui du ToLCNDV dont le génome est bipartite (Jyothsna et al., 2013; Sivalingam et al., 2010).

Dans la nature, il a été montré qu'un même betasatellite peut être assisté par diverses espèces virales (Nawaz-ul-Rehman et al., 2012) tandis qu'en conditions contrôlées, il a été montré que plusieurs begomovirus qui n'avaient jamais été observés comme associés aux betasatellites en conditions naturelles étaient capables de les trans-répliquer. Par exemple, c'est le cas pour les souches IL et Mild du TYLCV présentes sur le pourtour méditerranéen et introduites dans différentes régions du monde (Ito et al., 2009; Kon et al., 2009; Ueda et al., 2012; Zhang et al., 2009) ou pour le Cabbage leaf curl virus qui est un begomovirus à génome bipartite présent sur le continent américain (Nawaz-ul-Rehman et al., 2009). De plus, les betasatellites sont transmis par le vecteur commun à tous les begomovirus, l'aleurode *B. tabaci*. Cet événement potentiel d'association entre virus du genre *Begomovirus* et betasatellites présentent donc un risque important pour les cultures, notamment dans les zones qui en sont actuellement dépourvues.

Tout comme cela s'est produit lors d'introductions accidentelles de virus dans des zones de cultures, il est possible que des betasatellites étrangers soient introduits accidentellement et rencontrent des begomovirus indigènes ou nouvellement introduits dans des cultures du pourtour méditerranéen ou du continent américain. Par exemple, l'introduction en septembre

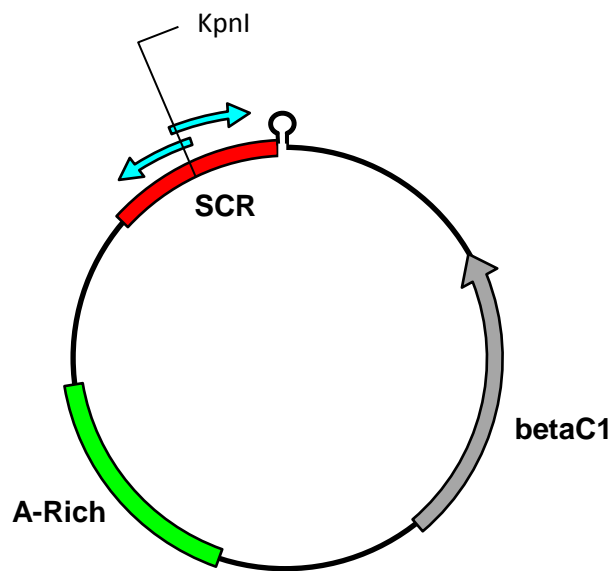


Figure 33 : Position des amorces de Briddon sur le génome de betasatellites

2012 en Espagne dans la province de Murcia sur des plantes de courgette (*Cucurbita pepo* L.) du ToLCNDV (Juárez et al., 2013) présente un risque important pour la filière maraîchère. Ce virus qui infecte en Inde diverses cultures telles que la tomate, la pomme de terre et le concombre y est détecté dans 44% des plantes en association avec un betasatellite dans son environnement naturel (Jyothsna et al., 2013). L'introduction d'un betasatellite dans son nouvel environnement et dans une des principales zones de production de plantes maraîchères en Europe, accentuerait le risque de sa pathogénicité sur les cultures.

Ce virus a probablement été introduit par le transport de plantes ou de vecteurs infectés tout comme pourrait l'être un satellite. Le contrôle du risque d'introduction de satellite passe par la sensibilisation des acteurs de toute la chaîne de production et de commercialisation des végétaux et par la maîtrise du diagnostic par les services chargés du contrôle phytosanitaire. En France, les services officiels chargés de ce contrôle sont les Services du Ministère de l'agriculture. Pour assurer ces contrôles, ses services s'appuient sur un réseau de laboratoires agréés et sur le laboratoire de la santé des végétaux de l'Agence nationale de la sécurité sanitaire (LSV-ANSES). Ce dernier a notamment pour mission de développer, valider et proposer des outils performants pour contrôler les menaces phytosanitaires émergentes ou potentiellement émergentes. Afin d'anticiper l'émergence de couples satellites-Begomovirus pouvant poser un problème en terme de pathogénicité, le LSV-ANSES doit disposer d'un test permettant d'identifier la présence de betasatellite dans le matériel végétal. Dans cette perspective, un des objectifs fixé dans le cadre de ma thèse était de définir des outils permettant de détecter l'ensemble des betasatellites décrits.

Actuellement, il existe un jeu d'amorces dit universel utilisé pour la détection des betasatellites et dessinées par Briddon et al., (2002) sur la base d'environ 260 séquences disponibles à cette époque. Ces amorces ciblent la SCR qui est la région conservée des betasatellites. Elles sont chevauchantes et permettent d'amplifier la totalité du génome (Figure 33). Un site unique de restriction, KpnI, a été introduit à l'extrémité 5' de chacune des deux amorces afin de faciliter le clonage du fragment amplifié. Depuis leur création plusieurs centaines de séquences ont été déposées dans les bases de données. Elles ont souvent été obtenues par séquençage de produits d'amplification générés avec les amorces de Briddon mais certaines ont été obtenues partir de produits d'amplification générés à l'aide de la polymérase Phi29 qui permet d'amplifier spécifiquement les ADN circulaires tels que les génomes de betasatellite. On peut donc légitimement se demander si les amorces de 2002 sont suffisamment inclusives et capables de détecter l'ensemble des séquences connues à ce jour.

Dans un premier temps, la validité des amorces de Briddon sur l'ensemble des séquences de betasatellites disponibles sur les bases de données a été testée *in-silico*. Dans un deuxième temps, à partir de l'alignement des séquences disponibles dans les bases de données, un outil de diagnostic permettant la détection de l'ensemble des betasatellites connus a été

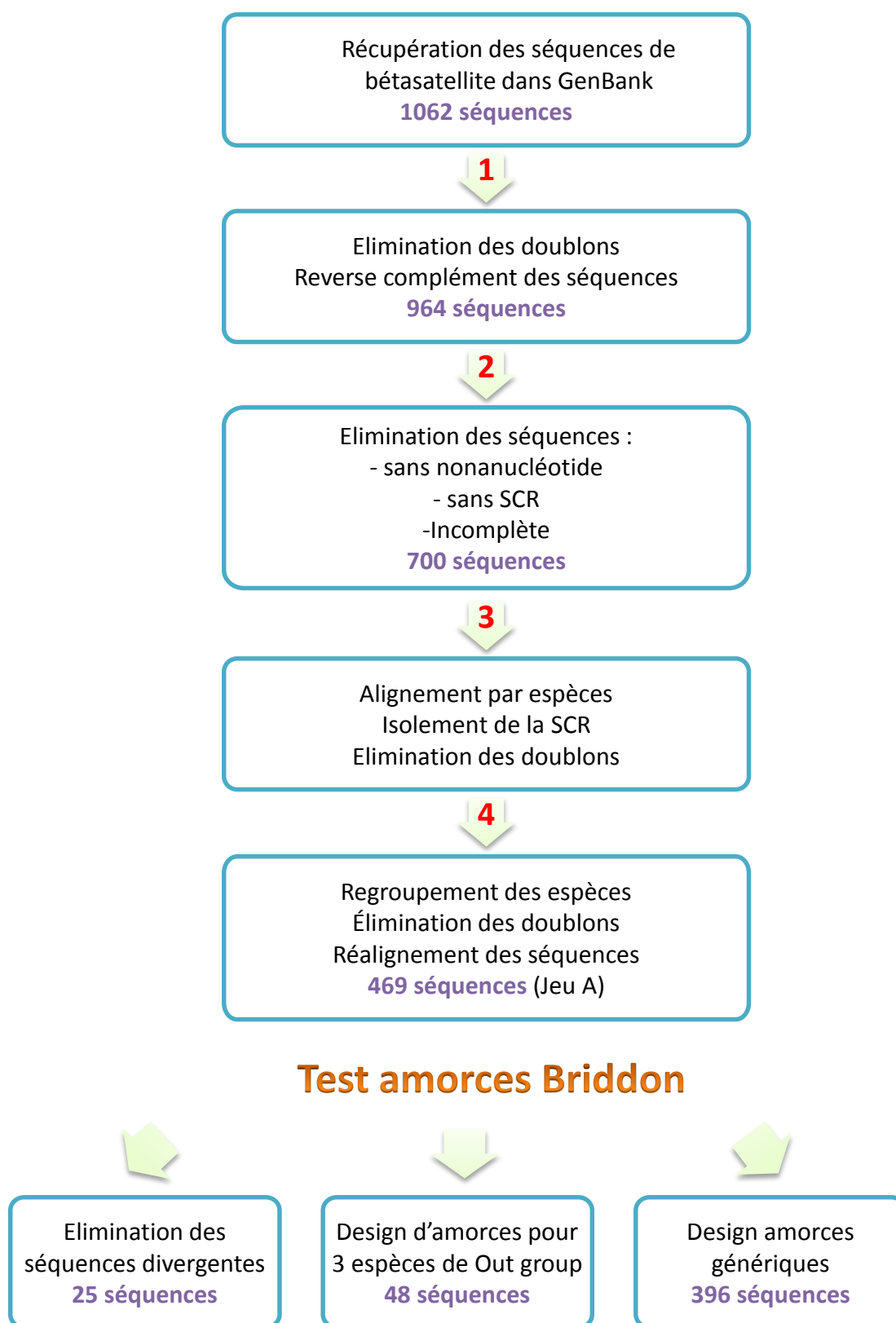


Figure 34: Méthodologie suivie pour la mise au point des amorces.

développé. Nous avons choisi d'utiliser la PCR comme outil de détection car c'est une méthode sensible, relativement peu coûteuse et adaptée à un usage en routine pour le diagnostic.

2. Matériel et méthodes : Définition du jeu de séquences de betasatellites

Dans un premier, l'ensemble des séquences de betasatellites disponibles dans les banques de données ont été collectées à partir du mot clef « betasatellites ». En mai 2014, cela représentait 1062 séquences présentes dans GenBank. Dans l'ensemble de ces séquences, il y avait de nombreuses séquences de betasatellites qui n'avaient pas une structure génomique attendue pour les betasatellites : certaines étaient tronquées, d'autres faisaient le double de la taille attendue, d'autres encore avait 2 tiges boucles. Dans un deuxième temps, un tri a été effectué afin d'obtenir un jeu de données correspondant à des structure génomiques attendues pour des betasatellites. Puis, les séquences de SCR utilisées pour tester *in silico* l'hybridation des amorces de Briddon et al., (2002) et définir de nouvelles amorces ont été isolées. La méthodologie est présentée schématiquement sur la [Figure 34](#) et résumée de la façon suivante :

- 1) Les séquences en doublon ont été éliminées. Les séquences restantes ont ensuite été affichées sous la forme reverse complémentaire de façon à avoir la partie correspondante à la SCR en début de séquence ([Figure 35](#)). Ce retournement permettait d'aligner le début des séquences commençant ainsi par le motif nonanucléotidique conservé TAATATTAC.
- 2) Cela a permis d'éliminer les séquences trop longues (>1450 nts) ou les séquences anormalement courtes (<1000 nts). Les séquences qui n'avaient pas le motif conservé nonanucléotide et celles qui n'avaient pas la SCR ont également été éliminées.
- 3) Les 700 séquences restantes ont ensuite été groupées par espèce en respectant le nom qui leur a été attribué et qui est défini par les règles de nomenclature des betasatellites (Briddon et al., 2008). Les groupes qui avaient moins de 5 séquences ont été réunis au sein d'un même ensemble et traité comme les autres groupes. Au sein de chaque groupe, les séquences ont été alignées avec le programme Clustal W version 1.4 (Thompson et al., 1994) disponible dans le logiciel BioEdit (Hall, 1999). Dans ces groupes, seules les 120 premiers nucléotides de chaque séquence, qui correspondent à la SCR (Zhou, 2013), ont été conservés ; Toutes les séquences en doublons restantes ont été éliminées afin de ne conserver qu'un représentant pour chaque séquence.
- 4) les représentants uniques de tous les groupes ont été regroupés puis alignés. Cet alignement a révélé que des membres appartenant à des espèces différentes pouvaient présenter 100% d'identité dans cette région de 120 nts. De nouveau, les séquences en double ont été éliminées afin qu'un seul représentant de chaque séquence soit conservé. L'examen de l'alignement des 120 nts de la SCR de l'ensemble des groupes a révélé une divergence très importantes sur les 19 derniers nts (ce sont en réalité les 19 premiers nts

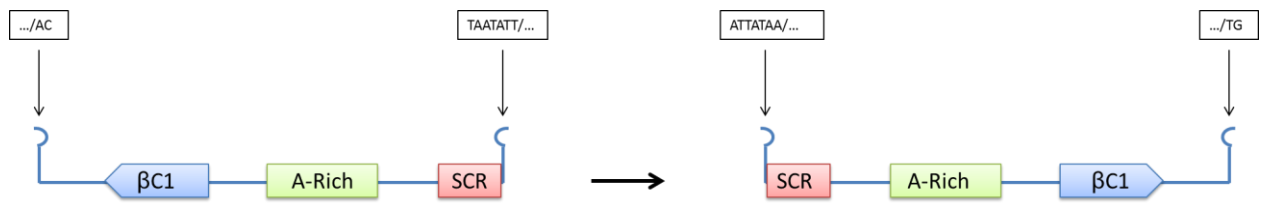


Figure 35 : Méthodologie : Reverse complément des séquences de betasatellite

de la SCR car nous travaillons sur les séquences reverse complémentaires des SCR, comme précisé précédemment). Ces derniers 19 nts ont donc été exclus de la région d'analyse et la région finalement retenue a été réduite à 102 nts. Après élimination des doublons, il me restait ainsi 469 séquences différentes de SCR (jeu A). Ce jeu de séquence (jeu A) a été utilisé pour tester la capacité d'accrochage *in silico* des amorces de Briddon.

3. Résultats

3.1. Un jeu de séquences comportant beaucoup d'erreurs

De nombreuses erreurs de séquençage nous ont amené à faire un tri important dans les séquences collectées dans les bases de données. Après élimination de séquences qui n'avaient pas la structure classique de betasatellite ou qui n'avaient pas la SCR, nous nous sommes rendu compte de la présence d'un site KpnI dans la région de la SCR pour un grand nombre de séquences. Ce site a été introduit en 5' dans les amorces de Briddon pour permettre le clonage des fragments amplifiés. Ce résultat suggère que les séquences brutes obtenues avec ces amorces ont été déposées tel quelles et n'ont pas fait l'objet d'une vérification par un séquençage spécifique de la séquence réellement présente dans cette région.

3.2. Une grande diversité des effectifs pour chaque espèce

Sur l'ensemble des betasatellites actuellement connus, 108 espèces différentes ont été répertoriées selon la nomenclature recommandé par Briddon et al., 2008 (Tableau 15). Le nombre de représentant de chaque espèce est très variable. Les plus nombreux sont les CLCuMB et le TYLCCNB avec respectivement 159 et 111 séquences par espèce. On peut noter que sur les 108 espèces répertoriées, 18 n'ont qu'un seul représentant et seulement 8 ont plus de 30 représentants. Les 102 nts des SCR des 469 séquences uniques analysées montrent 54 % d'identité.

3.3. La capacité de détection des amorces de Briddon.

Dans un premier temps, la capacité d'hybridation des amorces de Briddon a été vérifiée *in silico*. L'alignement des séquences de SCR avec chacune des amorces de Briddon a révélé que pour certaines espèces, l'appariement était mauvais, notamment avec l'amorce anti-sens (Figure 36). C'est notamment le cas des espèces *Ageratum leaf curl Cameroon betasatellite*, *Ipomoea betasatellite*, *Ageratum yellow leaf curl betasatellite*, *siegesbeckia yellow vein betasatellite*, *Ageratum yellow vein China betasatellite*, *honeysuckle yellow vein betasatellite* et *pepper leaf curl betasatellite* (en grisé dans le Tableau 15). Un dendrogramme construit à partir de la SCR d'un représentant de chaque espèce de betasatellite, dont ces espèces divergentes, montre qu'en effet certaines de ces espèces présentent une certaine divergence au niveau de leur SCR (Figure 37).

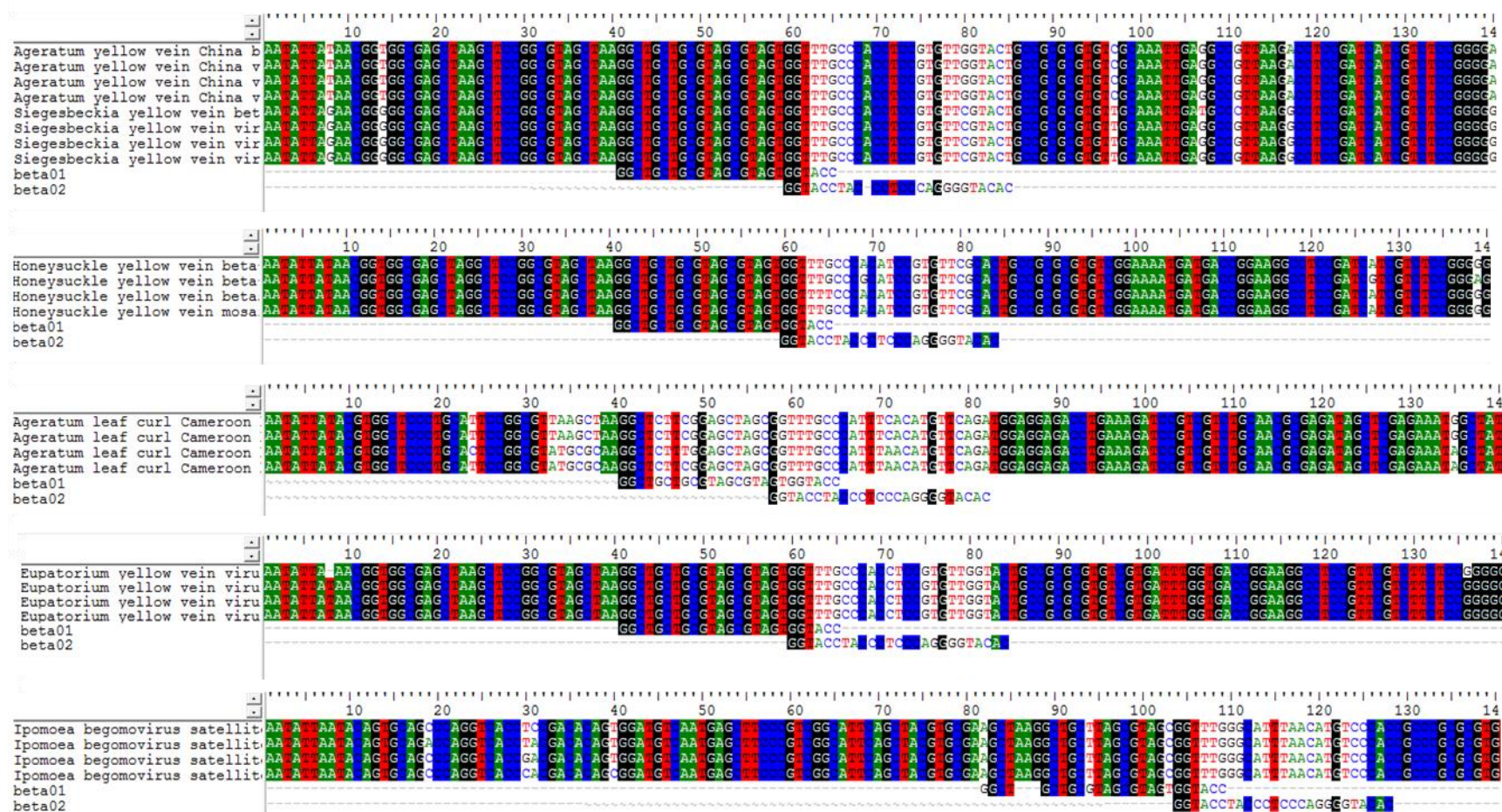


Figure 36 : Mise en évidence du mauvais appariement de l'amorce anti-sens de Briddon sur les séquences de 6 espèces de betasatellites. Beta01 est l'amorce sens ; beta 02 est l'amorce anti-sens.

Nous avons vérifié que les séquences *Ageratum leaf curl Cameroon betasatellite*, *Ipomoea betasatellite honeysuckle yellow vein betasatellite* avaient été obtenues autrement que par les amorces de Briddon (RCA, autres amorces).

Suite à ce résultat, nous avons choisi de mettre au point de nouvelles amorces prenant en compte la diversité des séquences de satellites présentes dans les bases de données.

3.4. Définition de nouvelles amorces universelles pour la détection des betasatellites

L'analyse de l'alignement de la SCR a montré qu'un seul couple d'amorce unique, même avec des positions dégénérées, ne pourrait pas amplifier tous les betasatellites disponibles dans les banques de séquences. Le jeu A a alors été séparé en 3 parties.

- 1- Les espèces qui avaient une SCR totalement différente des autres ont été rassemblées dans un groupe appelé « out group ». Il s'agit des espèces *Ageratum leaf curl Cameroon betasatellite*, *Ipomoea betasatellite*, *honeysuckle yellow vein betasatellite* (en rouge dans le [Tableau 15](#)), 3 espèces pour lesquelles nous avons montré que l'amorce anti-sens de Briddon ne pouvait amplifier le génome. Un jeu d'amorces spécifiques a été spécialement conçu pour cet « out group ».
- 2- Sur les séquences restantes, 25 individus se distinguaient au sein de leur groupe par une succession de nucléotides divergents dans la région de la SCR ([Tableau 16](#)). Comme ces séquences étaient minoritaires, voir unique dans leur groupe, elles ont été considérées comme non représentatives de la région SCR et potentiellement pouvant correspondre à des événements de recombinaison. Ces 25 séquences ont donc été éliminées du jeu de données.
- 3- Finalement 396 séquences uniques de SCR ont été conservées. À partir de l'alignement des séquences retenues, le polymorphisme des positions nucléotidiques de la SCR a été analysé ([Tableau 17](#)). Le nombre de séquences pour lesquelles les nucléotides divergeaient du consensus à chaque position de la SCR a été répertorié. Cela nous a permis d'identifier la région la moins variable de l'alignement pour définir des amorces.

Un couple d'amorces dégénérées prenant en compte la diversité des séquences a été conçu ([Tableau 18](#)). Les régions de la SCR comprises entre les positions 26 et 46 pour l'amorce sens et 70 et 93 pour la l'amorce anti-sens ont été choisies. Elles correspondent aux régions présentant le moins de polymorphisme. Ces amorces ont été positionnées de façon à minimiser le nombre de position à dégénérer. Quatre positions ont été dégénérées sur l'amorce sens et 3 sur l'amorce anti-sens. Ces nouvelles amorces permettent d'amplifier un fragment d'environ 1300 pb, soit la quasi-totalité du génome. Si on considère l'ensemble de séquences obtenues par la combinaison des dégénérescences de ces 7 positions, on constate que certaines ne correspondent à aucune séquence de betasatellite de notre jeu de données. Nous avons donc en parallèle proposé d'utiliser un mélange d'amorces non dégénérées, ne

Tableau 15: Nombre de séquences de SCR de betasatellite, disponibles dans les bases de données en mai 2014 par espèce et retenues pour la détection des betasatellites par PCR. Les espèces présentant un mauvais appariement avec les amorces de Briddon sont représentées dans les cases grises. Les espèces du « out group » sont représentées en rouge.

Espèce	Nombre de séquences	Espèce	Nombre de séquences	Espèce	Nombre de séquences	Espèce	Nombre de séquences
Ageratum leaf curl betasatellite	10	Eupatorium yellow vein	4	Okra yellow vein	4	Tomato leaf curl hajipur	2
Ageratum leaf curl cameroon	12	French bean leaf curl	2	Papaya leaf curl	19	Tomato leaf curl java	4
Ageratum yellow leaf curl	13	Hedyotis uncinella yellow mosaic	2	Pepper leaf curl	9	Tomato leaf curl Joydebpur	14
Ageratum yellow vein china	17	Hollyhock leaf crumple	2	Potato apical leaf curl	2	Tomato leaf curl kamataka	2
Ageratum yellow vein	11	Honeysuckle yellow vein mosaic	19	Potato leaf curl defective beta	1	Tomato leaf curl Maharastra	1
Alternanthera yellow vein	2	Ipomoea	17	Radish leaf curl	9	Tomato leaf curl new delhi	6
Andrographis yellow vein leaf curl	1	Kenaf leaf curl betasatellite	2	Raphanus leaf curl	1	Tomato leaf curl pakistan	1
Bemisia	16	Lantana yellow vein	1	Recombinant cotton leaf curl virus	1	Tomato leaf curl patna	4
Bhendi yellow vein	40	Leucas zeylanica yellow vein	2	Rose leaf curl betasatellite	2	Tomato leaf curl philippine	3
Bitter melon leaf curl	2	Lindernia anagallis yellow vein	2	Sauropus leaf curl	5	Tomato leaf curl ranchi	2
Calendula yellow vein	1	Ludwigia leaf distortion	7	Sida leaf curl	5	Tomato leaf curl togo	2
Cardiospermum yellow leaf curl	2	Ludwigia yellow vein	2	Sida yellow mosaic	5	Tomato leaf curl vietnam	3
Chilli leaf curl	33	Luffa begomovirus associated	5	Sida yellow vein virus satellite	6	Tomato leaf curl yemen	7
Corchorus yellow vein	2	Malachra yellow vein mosaic	2	Siegesbeckia yellow vein	7	Tomato yellow dwarf	2
Cotton leaf curl burewala	14	Malvastrum leaf curl	6	Spinach yellow vein	1	Tomato yellow leaf curl China	111
Cotton leaf curl Bangalore	3	Malvastrum yellow mosaic	8	Squash leaf curl	1	TYLC-mali	2
Cotton leaf curl	64	Malvastrum yellow vein	32	Sunflower leaf curl	1	TYLC-oman	1
Cotton leaf curl Gezira	24	Malvastrum yellow vein yunnan	33	Tobacco curly shoot	8	Tyhc-thailand	10
Cotton leaf curl Multan	159	Marigold leaf curl	1	Tobacco leaf chlorosis	3	TYLCV	15
Cowpea severe leaf curl	2	Mentha leaf deformity	1	Tobacco leaf curl	6	TYLC-vietnam	2
Croton yellow vein mosaic	21	Mesta yellow vein mosaic	3	Tobacco leaf curl Yunnan	6	Unknown	4
Cucurbita yellow vein	2	Mimosa yellow leaf curl	2	Tomato leaf curl	50	Verbesina yellow vein	1
Datura leaf curl	1	Mungbean yellow mosaic India	2	Tomato leaf curl Bangalore	3	Veronica yellow vein	2
Digera arvensis yellow vein	4	Okcv	5	Tomato leaf curl Bangladesh	26	Vinca yellow vein	1
Eclipta yellow vein	1	Okra enation leaf curl	3	Tomato leaf curl china	17	Zinnia	5
Emilia yellow vein	3	Okra leaf curl	14	Tomato leaf curl gandhinagar	2		
Erectites yellow mosaic	2	Okra leaf curl mali	13	Tomato leaf curl guangxi	2		

ciblant que les positions présentes dans nos séquences. Nous obtenons ainsi un mélange de 8 amorces pour la partie sens et 9 pour la partie anti-sens (Tableau 19).

Cependant, nous n'avons pas pu tenir compte de tout le polymorphisme présent dans les régions choisies pour la définition des amorces. Afin de ne pas perdre cette information, les accessions pour lesquelles les amorces définies ne présentaient pas 100% d'identité ont été rassemblées dans le Tableau 20 et la position des nucléotides polymorphes ont été indiqués.

3.5. Le design des amorces pour les espèces du « out group »

Pour les espèces *Ipomoea begomovirus betasatellite*, *Honeysuckle yellow vein mosaic betasatellite* et *Ageratum leaf curl Cameroon betasatellite* dont les séquences étaient trop différentes du consensus, notamment dans la région conservée, elles ont fait l'objet d'un travail indépendant. Pour chacune des trois espèces, un couple d'amorce a été conçu dans la région la plus conservée correspondant à la SCR. Les amorces conçues pour chacune de ces espèces n'ont pas été dégénérées. Les séquences à l'intérieur de chacun des groupes étaient 100% identiques pour cette région (Tableau 21).

4. Discussion et perspectives

Depuis leurs découvertes dans la fin des années 90, une grande diversité de betasatellite a été décrite et leur nombre est passé de 260 en 2002 à plus de 1000 en 2014, regroupés de par leur séquence en plus de 100 espèces différentes. Les betasatellites viennent essentiellement d'Asie et d'Afrique et ont été isolés aussi bien à partir de plantes cultivées (Coton, tomate) que de plantes adventices (*Sida*, *Malachra*). Cependant on observe que le nombre de séquences disponibles est très différent selon les espèces : moins de 5 séquences disponibles pour 61 espèces contre plus de 30 séquences pour 8 espèces. Cela indique que les efforts d'échantillonnage et de séquençage sont très différents selon les espèces de betasatellite. Bien souvent, ces séquences proviennent d'un échantillonnage unique sur une plante symptomatique. On peut alors s'interroger sur la pertinence et la prévalence de ces satellites. L'analyse phylogénétique effectuée sur les SCR des 102 espèces de betasatellites à raison d'un représentant par espèce indique qu'il y a 67% de divergence nucléotidique dans cette région ce qui est plus faible que les observations faites par Briddon et al. (2003).

Le risque posé par les betasatellites en association avec des begomovirus ne doit pas être négligé pour plusieurs raisons. Des betasatellites ont été identifiés au Moyen Orient et au Mali en association avec des virus qu'on considérait comme monopartite. L'introduction récente en Espagne d'un begomovirus fréquemment associé en Inde à des betasatellites indique bien la faisabilité de cette hypothèse. De plus, la capacité des souches TYLCV IL et Mild, déjà présentes en France, à transrépliquer des betasatellites d'origine diverse a largement été démontrée par notre étude et par d'autres auteurs (Ito et al., 2009; Kon et al., 2009; Ueda et al., 2011). Le ToLC-betasatellite qui est actuellement détecté en Inde, au

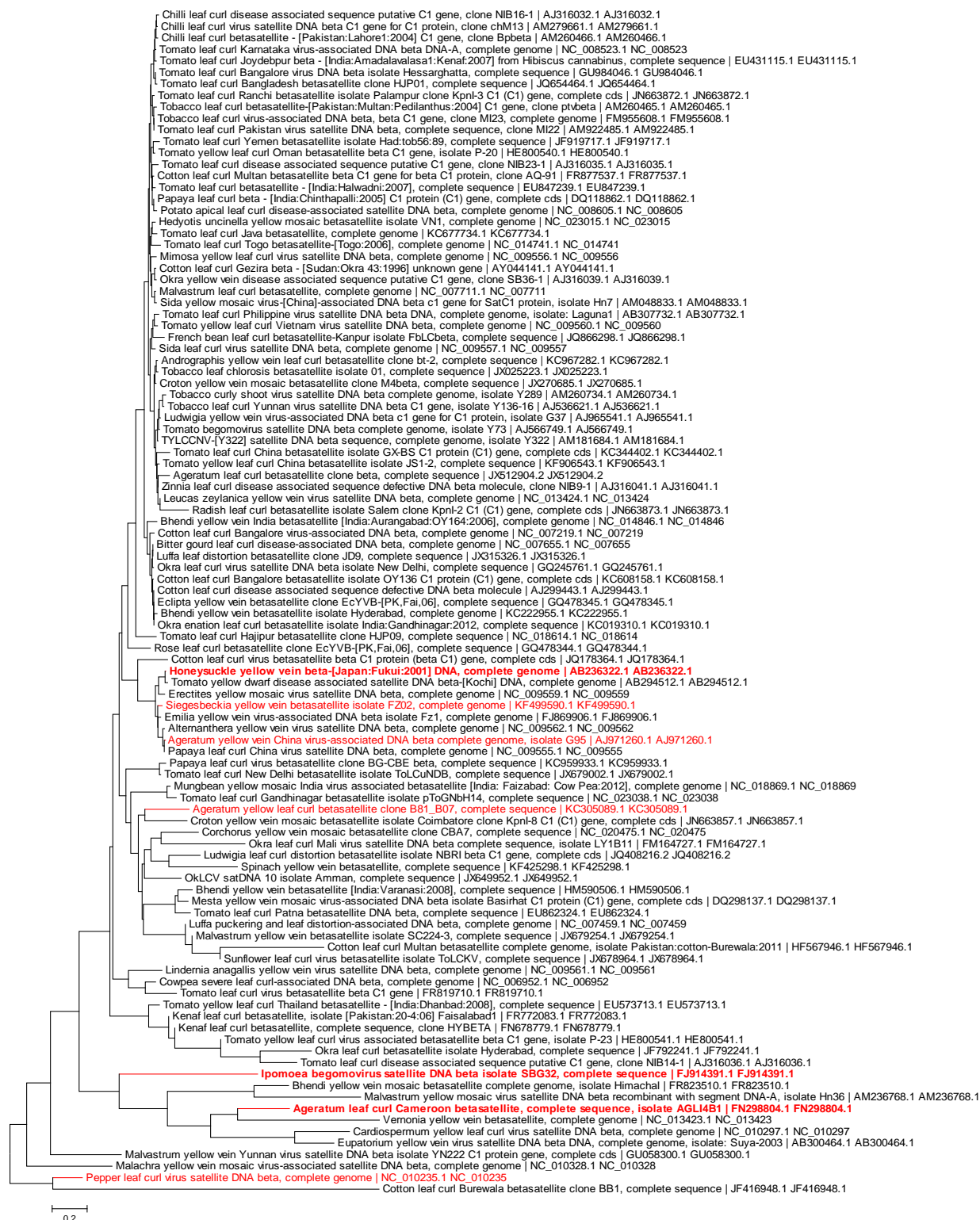


Figure 37: Analyse phylogénétique de la SCR de 102 espèces de betasatellite. Le dendrogramme a été construit avec l'alignement des 102 derniers nts de la SCR de 102 isolats (1 séquence par espèce). Il est basé sur un alignement des séquences par ClustalW. L'analyse a été effectuée dans MEGA6 en utilisant la méthode Neighbor-Joining. Les distances évolutives ont été calculées en utilisant la méthode « Maximum Composite Likelihood ». Les séquences divergentes qui ont été travaillées séparément pour l'obtention des séquences sont indiquées en rouge. Les numéros d'accèsions sont donnés pour chaque séquence. Les acronymes des isolats sont décrits dans le Tableau 1.

Pakistan et en Iran et qui est associé en conditions naturelles au TYLCV-OM et au ToLCOMV à Oman pourrait représenter la plus grande menace pour les cultures européennes (Briddon R, communication personnelle). La mise à disposition auprès des laboratoires nationaux d'outils pour le diagnostic est donc une priorité.

Quand on se rapporte à la littérature, on constate que les amorces de Briddon sont actuellement les plus utilisées pour la détection et le clonage de la majorité des satellites référencés alors que dans certains cas, la complémentarité avec les amorces est faible, notamment avec l'amorce anti-sens. J'ai montré par des alignements de séquences que ces amorces étaient théoriquement incapables de générer un produit d'amplification pour certaines espèces et que le défaut théorique d'amplification était souvent lié à un manque de complémentarité de l'amorce anti-sens. Ce défaut théorique a été confirmé car pour l'Ageratum yellow vein China betasatellite (AYVCNB), l'Ageratum leaf curl Cameroon betasatellite et l'Ipomoea betasatellite les amorces de Briddon n'ont pu être utilisées pour amplifier ces betasatellites (Geetanjali et al., 2013; Leke et al., 2012; Xiong et al., 2007). Les auteurs ont utilisé soit d'autres amorces soit une amplification par RCA.

A contrario, dans certains cas, alors que l'alignement de la séquence du betasatellite avec l'amorce anti-sens ne semblent pas permettre une amplification par PCR, le betasatellite a été détecté et séquencé grâce aux amorces de Briddon (Wu et al., 2007). Il est possible que dans des conditions peu stringentes, ces amorces réussissent à amplifier des séquences sans un appariement parfait. Alors que Briddon recommande d'utiliser ses amorces à une température supérieure à 50°C pour éviter l'amplification de produits aspécifiques, il les a parfois utilisées entre 45°C et 50°C, probablement quand les résultats d'amplification n'étaient pas concluants. Nous avons observé, comme d'autres auteurs (Ueda et al., 2008; Xiong et al., 2007), la présence de nombreuses bandes aspécifiques même dans les conditions d'utilisation définies par Briddon 2002 .

La mise au point de nouvelles amorces représente un challenge important pour la détection universelle des betasatellites. Le fait que personne n'ait mis au point de nouvelles amorces malgré la forte augmentation du nombre d'espèces et de séquences depuis 2002 suggère que cela n'est pas une tâche aisée. L'analyse des séquences a mis en évidence de nombreuses erreurs de séquençage et des lacunes dans la description des séquences. En effet, plusieurs séquences décrites comme complètes avaient une structure de génome très différente de celle qui est donnée pour les betasatellites (pas de SCR ou de structure en tige boucle contenant la séquence nonanucléotide, deux tiges boucles, etc). Cette multitude d'anomalies est probablement due à plusieurs facteurs tel que des erreurs de séquençage, ou au fait que certaines séquences ne correspondaient pas en réalité à des betasatellites natifs mais à des séquences recombinantes. En effet, on sait que comme les begomovirus, les betasatellites peuvent recombinaison avec des alphasatellites ou leurs begomovirus assistants (Huang et al., 2013; Saunders et al., 2001).

Tableau 16: Séquences éliminées car trop divergente des autres séquences de leur espèce dans la région SCR

Séquences divergente du consensus de l'espèce	Accession
Ageratum leaf curl betasatellite	JX512904.2
Ageratum leaf curl betasatellite	JQ408218.2
Ageratum leaf curl betasatellite	JQ710745.2
Ageratum leaf curl betasatellite	JQ408218.2
Ageratum yellow vein virus-associated DNA	AJ542497.1
Alternanthera yellow vein virus satellite DNA beta	NC_009562.1
Cotton leaf curl Multan betasatellite, isolate Pakistan:cotton-Burewala:2011	HF567946.1
Cotton leaf curl Multan betasatellite isolate FC2	HQ455351.2
Cotton leaf curl Multan betasatellite isolate ZhSh	HQ455368.2
Cotton leaf curl Multan virus satellite DNA beta	FJ159275.1
Cotton leaf curl Multan virus satellite DNA beta	FJ159274.1
Cotton leaf curl Multan virus satellite DNA beta	EF614159.1
Emilia yellow vein virus-associated DNA beta isolate Fz1	FJ869906.1
Ludwigia leaf distortion betasatellite isolate In:Var:Pum:08:2	HM101174.1
Malachra yellow vein mosaic virus-associated satellite DNA beta	NC_010328.1
Papaya leaf curl virus betasatellite from Carica papaya cv. African Dwarf C1 gene	EU126826.1
Rose leaf curl betasatellite	GQ478344.1
Sida yellow vein virus satellite DNA beta	NC_007213.1
Siegesbeckia yellow vein betasatellite isolate FZ02	KF499590.1
Tomato leaf curl Bangladesh betasatellite isolate Guntur	JN663859.1
Tomato leaf curl betasatellite isolate In:Var:Pum:08:3	HM101175.1
Tomato leaf curl China	KC344402.1
Tomato leaf curl Joydebpur betasatellite [India/Jaunpur/Chilli/2007]	HM007103.1
Tomato yellow dwarf disease associated satellite DNA beta-[Kochi] DNA	AB294512.1
Tomato yellow leaf curl Thailand virus satellite DNA beta isolate YN500	GU058324.1

Nous avons aussi décelé la présence du site de clonage KpnI (GGTACC) contenu dans les amorces de Briddon, ce qui suggère que de nombreuses séquences obtenues avec ces amorces n'ont pas été vérifiées dans cette région. Nous estimons qu'au moins 152 des 396 séquences retenues après élimination des doublons possèdent ce site puisque l'analyse du polymorphisme des nucléotides au niveau de ce site (nt 61 à 66 [Tableau 17](#)) indique que 152 séquences auraient un T à la place du A du motif GGTACC. Cela pose un véritable souci car la SCR étant la seule région conservée chez le betasatellites, c'est dans cette région que la conception d'amorces génériques est possible. Il est donc probable que la diversité nucléotidique ait été sous-estimée au niveau de la région d'accrochage des amorces de Briddon et cela pourrait avoir des conséquences sur la validité des amorces conçues.

Etant donné l'absence de spécificité pour la reconnaissance des betasatellites par les begomovirus, ils présentent tous potentiellement un risque en cas d'introduction et les outils à mettre en place devraient être efficace pour tous. Lors de notre analyse, nous avons tenu compte de la diversité des séquences dans la SCR en conservant au moins une séquence de chaque espèce pour la conception des amorces et nous avons éliminé le moins de séquences possible, soit 25 sur les 469 retenues après élimination des séquences erronées et des doublons.

La SCR étant une région du génome relativement courte, les possibilités d'y placer des amorces d'au moins 20 nts (une taille moyenne pour des amorces PCR) répondant aux critères habituels des amorces PCR sont réduites. Nous avons évité la séquence comportant le site KpnI puisque nous n'avons aucune certitude sur la valeur de ce site dans les séquences. De plus, la solution idéale avec un seul couple d'amorce générique capable de reconnaître toute la diversité extraite de la banque de séquence est très vite apparue comme impossible. C'est pour cela trois espèces divergentes de betasatellites ont été isolées du jeu de séquences et que pour chacune desquelles un couple d'amorce spécifique a été conçu (*Ipomoea begomovirus betasatellite*, *Honeysuckle yellow vein mosaic betasatellite* et *Ageratum leaf curl Cameroon betasatellite*).

Un couple d'amorce générique qui permet la détection de 93 % des séquences de betasatellite analysées a été conçu pour les autres séquences. Ce couple d'amorce est constitué de deux amorces qui peuvent être utilisées soit sous la forme dégénérées soit sous la forme d'un mélange de 8 amorces pour la partie sens et 9 amorces pour la partie anti-sens, représentatives des 396 séquences de betasatellites. Chacune des formes d'utilisation présente des avantages et des inconvénients. Il est évident que la commande d'amorces dégénérées permet de disposer de solutions d'amorces fiables, de composition connue et stable au cours du temps. Cependant, l'amorce sens sera constituée de 36 amorces différentes dont seulement 8 correspondent à nos cibles et pour l'amorce anti-sens, ce seront 9 des 18 amorces qui correspondront à nos cibles. Le choix d'utiliser un mélange d'amorces permettrait théoriquement d'augmenter la spécificité et la sensibilité du test. Le choix de la

Tableau 17: Polymorphisme nucléotidique de la SCR des betasatellites. Pour chaque nucléotide de la SCR, le nombre de séquences ayant un nucléotide différent du consensus est présenté en couleur. Les positions nucléotidiques des amorces sont données dans des cases violettes et illustrées sur le côté par les flèches jaunes. Les cases orange correspondent à des positions où le nucléotide majoritaire est présent chez 97% des séquences de betasatellites et les cases bleu à des positions qui sont 100% identiques chez tous les betasatellites. Le site KpnI est identifié en rose aux positions 61-66.

position	consensus	A	T	G	C	-	N
1	A					4	
2	A					4	
3	T					4	
4	A					4	
5	T					4	
6	T				1	4	
7	A					4	
8	G	87	71		78	2	
9	A		3		1	1	
10	A		1	72		2	
11	C			2		1	
12	G					2	
13	T	6		141			
14	G	1	128			1	
15	G	2				2	
16	G	3					
17	C	1					
18	G	2					
19	A		5				
20	G	1					
21	C	1	1				
22	T						
23	A			6	29	1	
24	A		9	13	3		
25	G					3	
26	C		2				
27	T				3		
28	C	1					
29	C	1				1	
30	G	1				1	
31	G				1	1	
32	C	1					
33	G						
34	T	3		1			
35	A						
36	G						
37	C						
38	T					1	
39	A		1	4			
40	-				4		
41	A		1	2			
42	G	3				1	
43	G	2					
44	C	2					
45	T						
46	G						
47	C	1				5	1
48	T	1			1	3	
49	G				2	1	
50	C		1			1	
51	G	1			3	1	

position	consensus	A	T	G	C	-	N
52	T	1			1	1	
53	A				1	1	
54	G	3				2	
55	C			1		3	
56	G	1	1			4	
57	T				2	5	
58	A				1	12	
59	G					2	
60	T	18			19	3	
61	G	1				4	
62	G	3				21	
63	T	1		1	1		
64	A		152			7	
65	C	3	150			7	
66	C		1			4	
67	-	2	5	2	8		
68	T	8		10	2	1	
69	A		4	2		7	
70	C	1	1			6	
71	C		1	1		5	
72	C		1	1		5	
73	T				3		
74	C		1				
75	C						
76	C						
77	A		1	2	2	3	
78	G	3	1		1		
79	G	1	1		1		
80	G						
81	G	1			2	3	
82	T			1	1		
83	A		1	1	2	2	
84	C		2	2			
85	A			11	1		
86	C		1				
87	A		1	2	2	1	
88	C	29	2				
89	C	1	12	2			
90	G				3		
91	C		1				
92	C			2			
93	G				2		
94	C	1	4			2	
95	G	2	2		1	1	
96	C		3			1	
97	G	2				1	
98	T			5	1	1	
99	G	1				2	
100	T	2			4	1	
101	C	1	10			1	
102	G	4			2	6	

forme utilisée pour le diagnostic dépendra de l'objectif et des contraintes du cahier des charges du laboratoire et des résultats de l'expérimentation.

Dans la procédure prévue, les tests pourront être réalisés avec les amorces génériques et ensuite avec les amorces spécifiques des 3 espèces. Etant donné l'hétérogénéité des efforts de séquençage réalisés sur les différentes espèces, il est difficile de juger de leur prévalence respective sur le terrain par rapport au nombre de séquences présentes ; par conséquent, bien que certaines de ces espèces comme *Ipomoea betasatellite* soient peu représentées dans les données de séquences le risque n'est pas nul. Ce travail ne remet cependant pas en cause la possibilité d'utiliser en complément les amorces de Briddon pour la détection des betasatellites. Même si elles ne permettent pas de détecter certaines espèces, elles ont largement fait leur preuve jusqu'ici et il sera donc judicieux de les utiliser en parallèle du nouveau jeu d'amorce lors de la validation des nouveaux couples d'amorces.

Pour le moment, le travail de mise au point d'un outil de diagnostic n'en est qu'aux étapes préliminaires. Les amorces n'ont été définies qu'*in silico* et leur capacité de détection reste pour le moment théorique. La prochaine étape sera de valider ces amorces sur une gamme de betasatellites couvrant le mieux possible la diversité connue. Ce travail était initialement prévu dans le cadre de la thèse et devait être réalisé avec des échantillons demandés à des laboratoires extérieurs travaillant sur des betasatellites. Malgré des réponses initiales parfois très volontaires pour nous aider à valider le test, nous n'avons reçu que deux échantillons de betasatellite, l'un en provenance du Burkina Faso et l'autre du Cameroun. Le faible nombre d'échantillon et notamment l'absence de betasatellite asiatique n'a pas permis d'engager l'étape de validation des amorces au laboratoire. Une mise au point des conditions de la PCR en conditions réelles (détermination du T_m exact des amorces, pourcentage de $MgCl_2$, polymérase utilisé) reste donc à effectuer. De plus, l'utilisation de ces amorces devra être validée par le protocole de l'ANSES, qui consiste à tester la sensibilité et la spécificité des amorces sur une dizaine d'échantillons cible et non cible. Pour pallier à cette absence de matériel végétal positif pour un betasatellite, il peut être envisagé de travailler sur des clones de betasatellite qu'il nous faudrait collecter auprès de la communauté des geminivirologues ou de faire synthétiser, puis cloner des SCR de betasatellites.

Enfin, il faut rappeler que ce travail a été effectué sur les 1062 séquences de betasatellites récupérées sur GenBank en mai 2014. Or, depuis le début de cette analyse, près de 200 nouvelles séquences ont été ajoutées aux bases de données. Aujourd'hui le nombre de séquences de betasatellites s'élève à 1249. Il est donc indispensable de confronter régulièrement les amorces définies avec les nouvelles séquences obtenues après mai 2014 pour adapter nos amorces.

Cette étude a permis de produire un jeu de séquences fiable des séquences entières de betasatellites et de leur SCR. Cette base a été utilisée pour le design de couples d'amorces

Tableau 18: Séquences et caractéristiques des amorces conçues pour la détection de l'ensemble des betasatellites.

Nom	Séquence	Tm (°C)	% GC
Générique_Fw	5'-RAGGCCGCHTCGAHTYCGAC-3'	52.5	55
Générique_Rev	5'-CGGCDDTGYGTACCCCTGGGAGGG-3'	62.2	66.7

Tableau 19: Amorces non dégénérées correspondant aux séquences des SCR disponibles dans le jeu de 396 séquences.

Amorces Sens
5'-AAGGCCGCATCGATTCCGAC-3'
5'-AAGGCCGCTTCGATTCCGAC-3'
5'-GAGGCCGCATCGATTCCGAC-3'
5'-GAGGCCGCATCGATTTGAC-3'
5'-GAGGCCGCATCGACTCCGAC-3'
5'-GAGGCCGCATCGAATCCGAC-3'
5'-GAGGCCGCTTCGATTCCGAC-3'
5'-GAGGCCGCCTCGATTCCGAC-3'
Amorces anti-sens
5'-CGGC G GTGCGTACCCCTGGGAGGG-3'
5'-CGGC A GTGCGTACCCCTGGGAGGG-3'
5'-CGGC A TTGCGTACCCCTGGGAGGG-3'
5'-CGGC G TTGCGTACCCCTGGGAGGG-3'
5'-CGGC G TTGTGTACCCCTGGGAGGG-3'
5'-CGGC G GTGTGTACCCCTGGGAGGG-3'
5'-CGGC A GTGTGTACCCCTGGGAGGG-3'
5'-CGGC T GTGTGTACCCCTGGGAGGG-3'
5'-CGGC G ATGTGTACCCCTGGGAGGG-3'

pouvant potentiellement détecter la grande majorité des satellites présents dans les bases de données en complément des amorces précédemment développées par Briddon. Etant donné le risque posé par les betasatellites en association avec les begomovirus, le contrôle du matériel à l'introduction est fortement préconisé.

Tableau 20: Liste des betasatellites les plus divergents dont les séquences ne sont pas 100% identiques ou complémentaires aux nouvelles amorces dégénérées (Tableau 4). Les positions non complémentaires de chacune des amorces sont présentées pour chacune des séquences. Les positions en rouge correspondent aux positions dégénérées sur l'amorce.

Séquences avec SNP	Accession	Position sur Fw 5'→3' (20 nt)	Position sur Rev 5'→3' (24 nt)
Ageratum leaf curl	NC_020889.1	5	12
Ageratum yellow leaf curl	HQ407397.1	5	
Bhendi yellow vein	EU188922.1		16
Bhendi yellow vein	GU111991.1		14
Bhendi yellow vein	GU111992.1		14
Chili leaf curl	JN638446.1	13 et 19	14 et 15 et 17 et 20
Chilli leaf curl	HM143904.1		10
Cotton leaf curl	GQ259599.2	20	
Cotton leaf curl	GQ370389.2	20	
Cotton leaf curl	JQ178364.1	17 et 20	
Cotton leaf curl	AM774308.1		15
Cotton leaf curl Gezira	FJ868829.1		18 et 20
Cotton leaf curl Multan	EF620565.1		8
Cotton leaf curl Multan	EF620566.1		12
Cotton leaf curl Multan	EU384597.1		18 et 19
Cotton leaf curl Multan	EU825206.1		12
Cotton leaf curl Multan	HE602956.1		4
Cotton leaf curl Multan	JF502376.1		2
Cotton leaf curl Multan	JF502378.1		3 et 4
Cotton leaf curl Multan	JF502380.1		4 et 8 et 12 et 20 et 21 et 23
Cotton leaf curl Multan	JF502387.1		8 et 9 et 10 et 13 et 14 et 18
Cotton leaf curl Multan	JF502391.1		13 et 19
Cotton leaf curl Multan	JF502395.1		8
Croton yellow leaf curl	AM410551.1	14	
Croton yellow leaf curl	EF597245.1	5 et 6 et 8	8 et 14 et 16
Croton yellow leaf curl	NC_008579.1	14	3 et 18 et 20 et 21 et 23 et 24
French bean leaf curl	JQ866298.1	13 et 21	16
Malvastrum yellow vein	AJ971700.1		14
Malvastrum yellow vein	AJ971702.1		15
Malvastrum yellow vein Yunnan	KC149951.1		9
Mimosa yellow mosaic	NC_009556.1	13	
Mungbean yellow mosaic	NC_018869.1	13	
Papaya leaf curl	HM143906.1		16
Papaya leaf curl	KC959934.1	8	1 et 2
Papaya leaf curl	KC959935.1	8	1 et 2 et 3
Papaya leaf curl	KC959933.1	8	
Radish leaf curl	GQ200444.1		1
Radish leaf curl	JF513201.1		2
Radish leaf curl	NC_010239.1		16
Tobacco curly shoot	AM260734.1		8 et 9 et 19
Tobacco curly shoot	AM260735.1		19

Séquences avec SNP	Accession	Position sur Fw 5'→3' (20 nt)	Position sur Rev 5'→3' (24 nt)
Tobacco leaf curl Yunnan	AJ536621.1		19
Tobacco leaf curl Yunnan	AJ536628.1		19
Tolc bangladesh	HM007099.1	6 et 5 et 9	
Tolc bangladesh	HM007115.1		1 et 2 et 3 et 8 et 9 et 13 et 21
Tolc bangladesh	HQ180397.1		12
Tolc china	KC344402.1	6 et 18	18
Tolc china	KC344403.1	4	5 et 8 et 16
Tolc philippine	AB307732.1		15 et 16
Tolc philippine	AB308071.1		12
Tolc togo	NC_014741.1		3
Tolcndv	JX679002.1		16
Tolcv	AJ542494.1		20
Tolcv	AJ542495.1		10
Tolcv	AY428768.1		17 et 18
Tolcv	AY438557.1	6	
Tolcv	AY438559.1		19
Tolcv	AY438560.1		3
Tolcv	EF068245.1		1 et 19
Tolcv	EF095958.1		16 et 19
Tolcv	FN435313.1		19
Tolcv	FR819710.1		19
Tolcv	HM989847.1		16 et 19 et 20
Tolcv patna	HQ180394.1		19
Tomato yellow leaf curl Thailand	GU058325.1	3	
Tomato yellow leaf curl Thailand	tous		19
Tylccnv	AJ421621.1		20
Tylccnv	AJ536624.1		20
Tylccnv	AJ536625.1		20
Tylccnv	AJ536626.1		20
Tylccnv	AJ536627.1		20
Tylccnv	AM980512.1		20
Tylccnv	GU058277.1		8
Tylccnv	GU058307.1		20
Tylccnv	KF906543.1		20
Tylcv	HE800541.1	7	
Tylcv	HE800542.1	7	
Tylcv	HE800545.1	7	
Tylcv	HE800550.1	7	
Zinnia	AJ542499.1		24

Tableau 21: Séquences et caractéristiques des amorces conçues pour la détection des espèces divergentes du jeu de séquences et rassemblées dans l' « out group »

Nom	Séquence	Tm (°C)	% GC
ALCCaB_FW	5'- CTAGGCAGCAGACGTTGCGCTC -3'	58.7	60.9
ALCCaB_Rev	5'- AAATGGGCAAACCGCTAGCTCC -3'	55	52.2
Ipomoea beta_FW	5'- GCCGACGGGAAGCTCATTGACATCC- 3'	60.5	60
Ipomoea beta_Rev	5'- CACGCGCGGGCGGTGGGACATG-3'	64.3	77.3
HYVMB_FW	5'- AACCACTACGCTACGCAGCACC-3'	56.9	59.1
HYVMB_Rev	5'- CATCATTTTCCGACACGCGCGGC -3 '	58.8	58.3

DISCUSSION GENERALE

L'analyse des informations disponibles sur les nombreux complexes virus/satellites qui existent en conditions naturelles a révélé que dans la majorité des cas, on ne disposait pas d'éléments permettant de comprendre le maintien de ces associations. Nous avons étudié, dans le cas particulier du TYLCV qui n'est pas connu pour assister des satellites en conditions naturelles, différents facteurs qui permettraient de faire des prédictions sur sa capacité à maintenir des associations avec des satellites de begomovirus.

Nous avons montré que le TYLCV-Mld était capable d'assister des alphasatellites et betasatellites, de les maintenir jusqu'à 150 dpi dans les plantes et de permettre leur transmission par vecteur. Les études de localisation cellulaire ont mis en évidence des proportions élevées de cellules coinfectées, mais aussi la présence de cellules infectées seulement par les satellites, ce qui suggère que ces derniers pourraient même se répliquer voire s'encapsider en l'absence de génome assistant au sein de ces cellules. Ces éléments sont tous en faveur du maintien de ces satellites par le TYLCV.

Le TYLCV-Mld semble interagir de façon différente avec les alphasatellites et les betasatellites. Malgré que les alphasatellites soient autonomes pour leur réplication, ils s'accumulent généralement moins que les betasatellites et n'ont pas ou extrêmement moins d'impact sur la fitness par rapport au betasatellite testé. La stratégie des alphasatellites semble donc être, de ne pas avoir d'effet délétère sur son complexe d'hôte (tomate/TYLCV) et de maintenir un niveau d'accumulation modeste mais constant tout au long du cycle d'infection. La seule expérience réalisée au temps tardif avec ce satellite montre qu'il s'accumule significativement davantage que le TYLCV-Mld et le betasatellite. On ne sait pas comment la proportion de cellules non infectées par le virus, mais productrice de génomes d'alphasatellites, participe à leur maintien dans la plante. Cet aspect a été discuté dans le chapitre 3 et des propositions ont été faites pour confirmer ces résultats. Cependant, la proportion importante de cellules co-infectées ($\geq 50\%$ à 32 dpi dans les feuilles systémiques) et l'efficacité de transmission par le vecteur naturel, *B. tabaci* (l'alphasatellite a été détecté dans 75% des plantes infectées par le TYLCV-Mld) sont cohérentes avec une probabilité élevée de maintien dans la plante.

L'impact important des betasatellites sur la pathogénie, son accumulation élevée et sa transmission efficace avec le TYLCV-Mld dans plus de 50% des plantes test confirment le risque que pourrait poser une telle association si elle venait à se produire dans des zones de production de tomate actuellement indemnes de ce type de satellite.

L'association TYLCV-Mld/CLCuGB présente des similitudes avec l'association CMV-ARNsat qui a, elle aussi, un effet négatif sur l'accumulation et la transmission du virus (Escriu et al., 2000). Pourtant des associations CMV/ARNsat sont détectées dans différentes parties du monde et sont responsables d'épidémies sur la tomate en France et en Espagne. Il ne faut donc pas

sous-estimer l'impact d'un satellite qui diminue l'accumulation de son virus assistant. On remarque d'ailleurs que le betasatellite ne réduit pas l'accumulation virale en dessous de son niveau détecté en absence de betasatellite sur des plantes au stade tardif. Ce niveau pourrait correspondre à un équilibre imposé par les interactions avec la plante et qui n'est apparemment pas modifié en présence du betasatellite. Bien que les rapports d'accumulation d'ADNs virus/betasatellite changent au cours du temps, ils ne semblent jamais défavorables à une transmission efficace du betasatellite par le vecteur car son accumulation se retrouve toujours supérieure ou égale à celle du virus. Pour le moment on ne sait pas si les cellules infectées par le betasatellite produisent des satellites « mobiles » participant à la colonisation de la plante. Si c'était le cas, l'avantage serait non négligeable pour le maintien du satellite car ces cellules représentent 25% des cellules infectées.

La littérature rapporte très peu de cas pour lesquels l'accumulation d'un bégomovirus diminue en présence de betasatellite. On pourrait supposer que si le virus et le satellite se maintiennent dans de tels cas, il ne saurait en être autrement dans les cas plus fréquents où l'accumulation du virus n'est pas diminuée par le betasatellite. Contrairement à ce qui est observé pour le TYLCV-Mld, le CLCuGB ne semble pas avoir d'impact sur l'accumulation du TYLCV-IL et son accumulation est même plus importante lorsqu'il est assisté par le TYLCV-IL plutôt que par le TYLCV-Mld à 150 dpi (chapitre 2 complément). Ces résultats suggèrent que la capacité de maintien du CLCuGB par le TYLCV-IL serait au moins aussi bonne que celle du TYLCV-Mld, bien que des tests de transmissions devraient être réalisés pour confirmer cette hypothèse.

Les résultats obtenus dans cette étude avec les deux souches de TYLCV montrent que les profils d'accumulation du virus et du satellite peuvent être différents selon la date à laquelle on les a mesurés ; pourtant, dans la plupart des études, un seul point de temps est analysé, ou parfois même, seule l'accumulation du virus est estimée. L'étude de la dynamique d'accumulation des différentes molécules par qPCR et l'utilisation pour la première fois de la méthode FISH pour localiser les satellites au niveau cellulaire, permettent d'avoir une meilleure compréhension du fonctionnement du système étudié, et notre étude en ce sens est originale par la diversité des approches utilisées sur un même modèle. Ces mêmes techniques pourraient être appliquées à des bégomovirus pour lesquels l'association virus/satellite a été rencontrée en conditions naturelles, en distinguant ceux pour lesquels l'association est opportuniste, de ceux pour lesquels l'association est obligatoire. En effet dans une association obligatoire, le satellite apporte incontestablement un bénéfice au virus assistant, et le maintien du satellite est assuré par le gain de valeur sélective que le satellite apporte au virus par rapport à celle du virus seul. Il est donc difficile de prévoir comment une telle interaction se traduit sur le plan de la co-infection cellulaire et sur le niveau relatif d'accumulation virus/satellite. Par contre, dans le cas d'une association virus/satellite opportuniste, dans laquelle le satellite peut éventuellement n'apporter aucun gain de valeur sélective, comme c'est le cas des ARN satellites du CMV, on s'attend à trouver une interaction

de type hyperparasite qui ne peut exister que si le satellite réussit à optimiser ses chances d'être transmis. Ainsi on s'attend à ce qu'une majorité de cellules soient co-infectées et que le satellite s'accumule de façon dominante comme c'est le cas du CLCuGB avec le TYLCV. Notre approche permettrait peut-être aussi de distinguer ces profils d'interaction avec ceux de couples opportunistes dans lesquels le satellite, bien que non-obligatoire, puisse apporter un gain de valeur sélective. Les seules données disponibles sur la dynamique d'accumulation à la fois du bégomovirus assistant et de satellites ont été précisément obtenues pour un tel couple, à savoir ToLCNDV/CLCuMB (Jyothsna et al., 2013). Ces auteurs montrent en effet que le CLCuMB a un impact variable mais globalement neutre, sur l'accumulation du composant A au cours du temps, mais par contre, double l'accumulation du composant B (Jyothsna et al., 2013), et double l'efficacité de transmission du ToLCNDV par rapport au virus seul (Sivalingam and Varma, 2012). Cependant, d'après la comparaison des dynamiques d'accumulation du ToLCNDV et de CLCuMB que Jyotshna et al. (2013) présentent mais ne décrivent pas, la concentration de l'ADN du betasatellite est inférieure d'un facteur 10 à celle des composants A et B, ce qui est cohérent avec le fait que le betasatellite n'est pas systématiquement transmis avec le virus (Sivalingam and Varma, 2012). Malgré la faible accumulation du satellite par rapport à celle du virus, 44% des plantes de différentes espèces infectées par le ToLCNDV sont trouvées en co-infection avec un betasatellite.

Sur la base des résultats obtenus avec le couple TYLCV/CLCuGB sur une période d'infection de 1 mois, on peut considérer que la forte accumulation du betasatellite par rapport au virus, permettrait le maintien du couple TYLCV/CLCuGB, tandis que la réduction de l'accumulation du virus assistant tendrait à réduire l'efficacité de transmission du virus. Malgré sa forte accumulation par rapport au virus, le CLCuGB, tout comme le CLCuMB, n'est pas systématiquement transmis avec son virus assistant. Comme décrit pour l'ARN satellite du CMV, ce défaut pourrait être compensé par une forte densité de vecteur (Escriu et al., 2003).

Le seul exemple connu d'association de TYLCV avec un betasatellite est celui de la souche TYLCV-Oman qui a été détectée avec le ToLCB et un alphasatellite dans le Sultanat d'Oman (Idris et al., 2011; Khan et al., 2008). La présence de ce betasatellite dans le Moyen-Orient et sa capacité à être transrépliqué efficacement par des bégomovirus infectant la tomate dans cette région du monde (TYLCV-OM, ToLCOMV), font penser qu'il pourrait se retrouver prochainement en co-infection avec les souches méditerranéennes de TYLCV. Il est cependant surprenant que, malgré que ces souches aient été introduites depuis plus de 10 ans dans des régions où des satellites existent (Chine, Japon), et qu'elles s'y soient propagées avec des conséquences agronomiques importantes (Ueda et al., 2004, 2005), des associations TYLCV/satellite n'y aient jamais été décrites. La capacité des betasatellites locaux à être transrépliqués par les souches méditerranéennes de TYLCV a été démontrée en condition expérimentale (Ito et al., 2009; Ueda et al., 2012; Zhang et al., 2009). Cependant, en dehors de quelques tests de détection de betasatellite sur 5 et 28 des échantillons de tomate infectés

par ces isolats de TYLCV, il n'y a pas eu de véritable enquête permettant de savoir si les betasatellites locaux pouvaient se trouver en association avec le TYLCV dans des plantes cultivées ou adventices. Il est possible que la symptomatologie des associations virus/betasatellite sur la tomate présente dans ces pays soit déjà très forte et que les possibles cas d'association du TYLCV avec des satellites ne se distinguent pas des autres complexes présents localement ; ou encore que les régions où le TYLCV a été introduit, soient géographiquement isolées de celles où les satellites sont présents ; ou encore qu'il y a peu ou pas de transfert de populations de *B. tabaci* entre les cultures de tomate et les plantes hébergeant les satellites.

Il n'y a pas de betasatellite en Europe et le risque encouru par les cultures est très différent de celui qui prévaut en Asie par exemple. Les principales espèces de begomovirus présentes en Europe et dans le pourtour méditerranéen sont essentiellement réduites aux souches de TYLCV et TYLCSV et aux génomes recombinants entre ces deux espèces (Belabess et al., 2015; García-Andrés et al., 2006; Navas-Castillo et al., 1997). Il est difficile de prévoir quelles seraient les chances de maintien d'un betasatellite introduit dans un tel environnement. Bien que cela soit surprenant, comparé au nombre de cas d'introduction de TYLCV dans de nombreuses régions du monde, il n'y a, à notre connaissance, aucune description d'introduction de betasatellite dans des zones indemnes. Par contre il y a une suspicion sur un cas d'introduction d'un alphasatellite au Japon en ce qui concerne le Sida yellow vein China alphasatellite (SiYCCNA) trouvé en association avec le TYLCV-IL (Shahid et al., 2014). D'après les auteurs, c'est la première fois qu'un alphasatellite est détecté au Japon. La séquence de l'isolat détecté présente plus de 98% d'identité nucléotidique avec celle de l'isolat SiYCCNA détecté précédemment au Népal en association avec AYVV et Tomato leaf curl Java betasatellite (ToLCJaB). Etant donné que ce satellite a également été retrouvé au Japon en association avec ce même complexe virus/betasatellite, les auteurs supposent que les 3 molécules pourraient avoir été introduites au Japon. Une introduction de satellite n'est donc pas improbable. Des études approfondies sur les plantes réservoirs présentes dans les zones où existent des betasatellites et des contrôles de ces molécules lors des transferts de matériel végétal, permettraient de mieux anticiper les risques de propagation de ces molécules vers de nouvelles zones.

En dehors des cas où le satellite est indispensable à l'infection par le virus et est associé à des maladies importantes, comme par exemple sur le coton (CLCuMB), il y a généralement très peu de données épidémiologiques sur les associations virus/satellites et notamment pour les begomovirus. Le plus souvent, les études qui ont conduit à la description de betasatellites sont basées sur la présence de symptômes particuliers et le nombre d'échantillons étudiés est relativement faible, le plus souvent 1 à 10 plantes. Le caractère non indispensable des

betasatellites dans la plupart des infections causées par des bégomovirus et la flexibilité des betasatellites vis-à-vis des bégomovirus nous fait penser que le rôle de l'environnement (plantes réservoirs, pullulation de *B. tabaci*) est important. Cet aspect a été étudié dans le cas des souches nécrotiques des ARN satellites du CMV qui ont un impact négatif sur l'accumulation du virus et sa transmission. Pourtant elles sont capables d'émerger en provoquant des dégâts sur tomate. Les conditions d'émergence de ces souches ont été prédites à l'aide d'un modèle déterministe basé sur des paramètres de fitness estimés expérimentalement. Une des conditions prédites par le modèle est une forte densité de vecteur. Dans le cas des bégomovirus, les pullulations de *B. tabaci*, ne sont pas rares, et pourraient expliquer certaines des associations opportunistes avec des betasatellites. Dans ce scénario, les associations dites obligatoires telles que le CLCuGV/CLCuGB serviraient de réservoirs à partir desquels d'autres bégomovirus seraient contaminés. La découverte du CLCuGB en association avec le TYLCMLV au Mali est cohérente avec un tel scénario. En effet, le CLCuGB trouvé avec le TYLCMLV, appartient à une espèce qui est indispensable au CLCuGV sur gombo alors que le TYLCMLV est un bégomovirus qui n'a pas besoin de betasatellite pour établir une infection symptomatique sur tomate (Chen et al., 2009). La transmission par un vecteur unique (*B. tabaci*) et la capacité pour les betasatellites à être transrépliqués par différentes espèces virales facilitent ce type de réassortiment. L'absence d'enquête approfondie sur le terrain ne permet pas de savoir si cette association, détectée dans un échantillon au Mali, représente un cas accidentel de rencontre entre un betasatellite de malvacée et un bégomovirus de tomate, ou si elle est fréquente. Des échantillonnages plus conséquents sont nécessaires pour mieux comprendre, au niveau de l'agroécosystème, la nature, l'importance et le sens des flux de satellites entre « compartiments » obligatoires et compartiments opportunistes. De tels échantillons pourraient être analysés avec à priori, par PCR ciblées sur des satellites connus dans l'environnement échantillonné, ou, avec davantage de moyens financiers, avec une approche sans à priori par métagénomique.

Une telle étude conduirait peut être à une révision de la nomenclature actuelle des betasatellites. Habituellement, lorsqu'un satellite est détecté pour la première fois en association avec un bégomovirus, vraisemblablement sur une plante présentant un symptôme relativement sévère, le nom du satellite est fatalement dérivé du nom du bégomovirus associé. Or, il est fort probable que cette association ne soit qu'accidentelle, et que ce satellite ait co-évolué avec un autre bégomovirus avec lequel il se trouve plus fréquemment, mais sans nécessairement provoquer des symptômes remarquables. Nous avons ainsi observé des incohérences de nomenclature lors de l'analyse des séquences de betasatellites pour la définition d'amorces permettant leur détection générique. Certains satellites nommés par rapport au virus associé dans la plante se sont révélés après séquençage être des isolats d'une autre espèce de betasatellite. La plante joue un rôle important dans le maintien des associations virus/satellite car certaines associations ne peuvent fonctionner dans certaines plantes hôtes. C'est ce qui a été observé pour des

associations d'ARN satellites avec des sobemovirus et pour le betasatellite CLCuGB qui ne peut assister le CLCuGV que pour l'infection du gombo mais pas celle du coton. L'infection du coton par le CLCuGV n'est possible qu'avec certains betasatellites tels que le CLCuMB. De nombreux begomovirus monopartites infectant la tomate ne sont pas connus pour avoir de satellites en condition naturelles. C'est le cas des espèces TYLCV, TYLCSV, ToLCV d'Afrique australe par exemple. Le fait que ces virus aient évolué sur cette plante hôte pourrait leur avoir permis de s'affranchir de la présence d'un betasatellite ou même d'un composant B. Pourtant, le TYLCCNV est resté dépendant de son betasatellite associé pour infecter symptomatiquement la tomate.

Nos résultats nous amènent à revoir les critères permettant d'expliquer le maintien des betasatellites par les begomovirus. Alors que les accumulations relatives de virus et de satellites au cours de l'infection semblent avoir un impact important sur la possible dissémination des satellites, la MOI pourrait ne pas être un facteur explicatif fort si les molécules de virus et de satellites ne doivent pas forcément être associées au niveau cellulaire pour assurer la transréplication du betasatellite.

L'analyse qualitative des ADN a mis en évidence l'accumulation de formes défectives de virus au stade tardif de l'infection dans les plantes infectées par le TYLCV seul ou avec des alphasatellites qui sont autonomes pour leur réplication. Par contre, ces formes semblent absentes en présence du betasatellite qui est répliqué par le virus. Nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives sur le rôle que pourraient jouer ces molécules dans des infections naturelles avec des virus ou dans des associations virus satellites.

ANNEXE

Annexe 1: Protocole inoculation par biolistique

Co-précipitation ADN/ μ particules d'or

- Pesée de 25 mg de μ billes d'or de diamètre 1 μ m. Les dans un tube eppendorf 1.5ml stérile.
- Ajouter aux billes 100 μ l de spermidine 0.05M (labo 49, congel, boîte jaune) (SM à 1M à diluer dans H₂O UO) puis vortexer (10sec) lentement et soniquer à 50-60Hz sur amplitude 40.
- Ajouter les 50 μ l d'ADN purifiés, vortexer très lentement 5s tout en ajout goutte a goutte du CaCl₂ 1M froid.
- 10 min à t° ambiante (précipitation) et centrifugation 15s à 12000 rpm. (Ne pas dépasser sinon colmatage du culot). Eliminer le surnageant.
- 3 lavages successifs du culot de billes avec 3x1ml d'éthanol absolu froid (bouteille neuve) et des centrifugation de 5 s à 12000 rpm.
- Transfert des billes d'or recouvertes d'ADN dans une solution de PVP 0.05mg/ml :
 - Préparation de 3ml de solution pour chaque construction avec 7.5 μ l de PVP 20mg/ml (dans éthanol absolu) et 3ml d'éthanol absolu froid. Maintenir dans la glace.
 - Transfert des billes des eppendorf dans des tubes à hémolyse de 10ml
 - Transfert par fraction de 200 μ l de PVP après aspiration/rejet/vortex...
 - Vider autant que faire ce peut l'eppendorf et laisser le tub à hémolyse contenant les billes recouverte d'ADN dans la glace jusqu'à la préparation des cartouches.

→ A cette étape on peut tout congeler à -20°C pour une durée de 1-2 mois.

Préparation des cartouches

Etape que l'on peut commencer dès les 10 min d'attente lors de la précipitation. A chaque tube correspond un kit de matériel stérile.

Préparation des tubes :

- Découpe des tubes Teztel en biseau du coté détenteur de la station et laisser au moins 5 cm dépasser de l'autre côté.
- Utilisation kit seringue de Biorad : un embout, une seringue de 10 ml et un morceau de tube flexible comme lien entre le tube Teztel et l'embout. Faire 2 ou 3 lavage a l'éthanol absolu et laisser l'éthanol environ 30s avant de le retirer doucement et le plus complètement possible.
- Mettre le tube doucement sur la station en envoyer le flux d'azote pendant 15 min. Les réglages sont de 3 au détenteur et entre 3-4 sur l'entrée de la station. A vérifier régulièrement. Azote 2500 psi.

- Une fois le tube sec, on le protège dans du papier absorbant jusqu'à son utilisation pour faire les cartouches.
- Eteindre l'azote.

Répartition des billes d'or :

- On vortex doucement le mélange bille/PVP sans le bouchon.
- Avec kit seringue on va aspirer **régulièrement** le mélange remis en suspension contenant les billes d'or pour qu'il se répartisse dans la partie centrale du tube Teztel.
→ Il faut éviter les bulles et le phénomène de reflux.
- Placer rapidement le tube sur la station et l'enfoncer jusqu'à la butée.
- Laisser les billes reposer 2 min
- Retirer doucement la solution en retenant bien le piston de la seringue pour éviter le reflux puis ôter le kit seringue.
- effectuer une rotation à 180° du tube et laisser 10 s pour que les billes se répartissent sur toute l'épaisseur du tube.
- Laisser en rotation pendant 20-30s.
- Déclencher le flux d'azote et laisser sécher 5 min jusqu'à qu'il n'y ait plus de goutte à l'extrémité du tube.
- Découper les cartouches à l'aide du « tubing cutting » sur la portion exploitable du tube recouvert de billes.
- On récupère en moyenne 50 cartouches que l'on conserve si nécessaire à -20°C

→ On doit s'assurer que les cartouches que l'on va utiliser ont une répartition homogène des billes sur toute leur longueur.

Bombardement

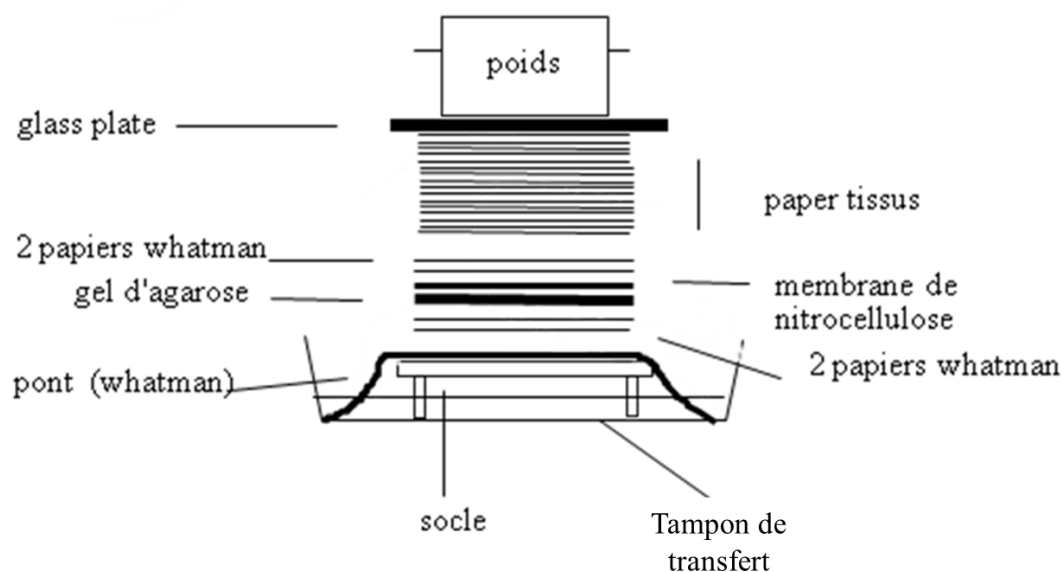
Matériel stérile pour chaque construction : 1 embout noir, 1 barillet, 1 rondelle + un éjecteur, du papier et une pince.

- Mettre la pile de 9V et vérifier le voyant batterie, brancher sur la bouteille d'hélium et régler sur 200 psi.
- Visser à fond l'ensemble dans le canon.
- Placer les cartouches dans le barillet, ouvrir le cylindre, disposer le barillet selon l'encoche et refermer le cylindre.
- Tirer en appuyant simultanément sur la gâchette et la sécurité
- Tirer sur des feuilles jeunes derrière lesquelles on place une surface en verre recouverte de papier absorbant stérile :
→ Il faut coller l'embout sur la feuille et l'impact doit laisser une auréole brune sur la feuille.

Annexe 2: Protocole standard du montage pour le transfert de l'ADN.

Utiliser une pipette comme rouleau à pâtisserie et mettre le gel à l'envers fond des puits vers le haut. Marquer les membranes en haut à droite. Et réaliser le transfert dans du tampon de transfert pendant une nuit 10 à 12h minimum.

Faire le montage suivant (le montage dépend de la taille du gel):



Le lendemain la membrane est neutralisée puis fixer comme décrit dans le matériel et méthode.

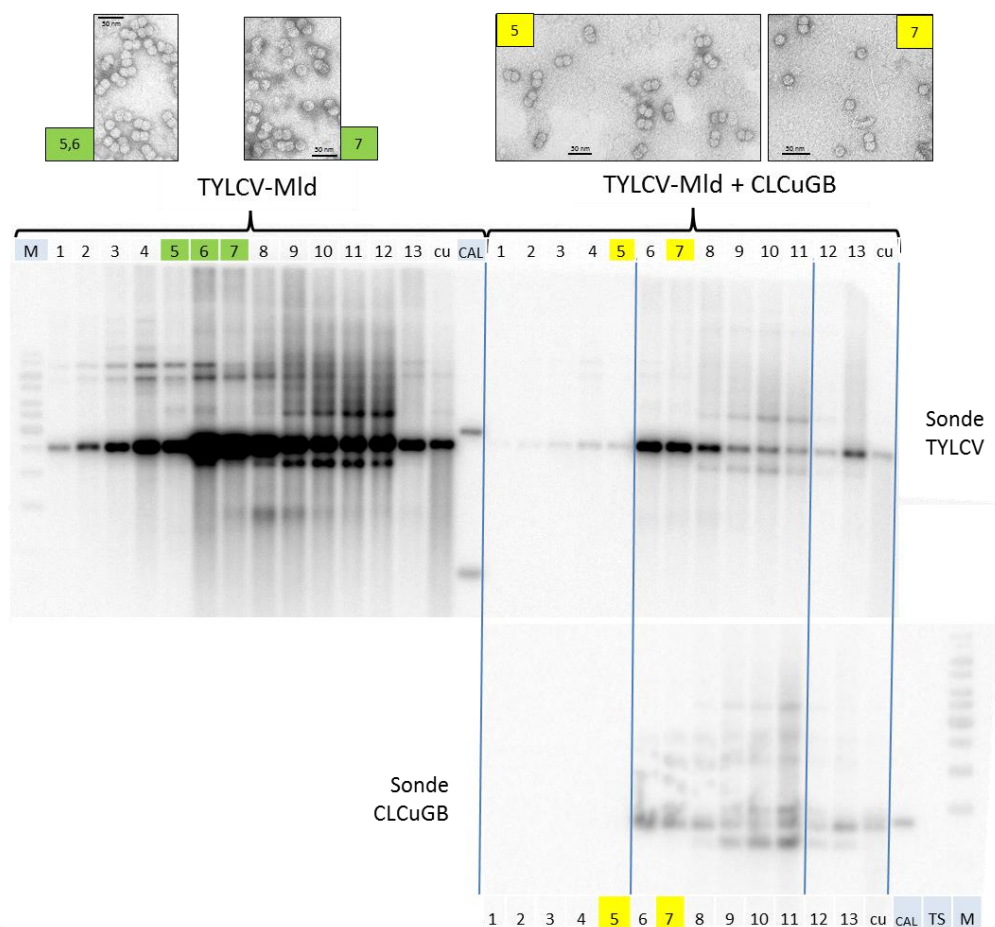
Annexe 3: Nombre de cellules infectées à 18 et 32 dpi dans les plants co-infectés par TYLCV+CLCuGA ou TYLCV+CLCuGB

Traitement		18 dpi			32 dpi		
TYLCV + CLCuGA	TYLCV	46	49	50	6	16	23
	CLCuGA	55	59	61	144	14	20
	Colocalisation	51	133	102	153	62	72
	total	152	241	213	303	92	115
TYLCV + CLCuGB	TYLCV	3	13	1	1	3	4
	CLCuGB	20	24	31	21	23	35
	Colocalisation	115	247	102	71	88	89
	total	138	284	134	93	114	128

Annexe 4: Estimation des accumulations d'ADN de TYLCV et de satellites dans les plantes analysées par FISH.

Date (dpi)	Traitement	Réplicat	N0 TYLCV /N0 25s	N0 sat /N0 25s	Rapport TYLCV/satellite
18	TYLCV+CLCuGA	1	4.32E-01	5.34E-01	0.81
18	TYLCV+CLCuGA	2	2.43E-01	2.33E-01	1.042
18	TYLCV+CLCuGA	3	3.58E-01	2.24E-01	1.593
32	TYLCV+CLCuGA	1	1.95E-01	1.89E-01	1.032
32	TYLCV+CLCuGA	2	2.28E-01	2.41E-01	0.945
32	TYLCV+CLCuGA	3	2.22E-01	2.42E-01	0.919
18	TYLCV+CLCuGB	1	2.95E-02	1.07E-01	0.275
18	TYLCV+CLCuGB	2	4.07E-02	9.15E-02	0.445
18	TYLCV+CLCuGB	3	4.40E-02	2.25E-01	0.196
32	TYLCV+CLCuGB	1	5.93E-02	3.27E-01	0.181
32	TYLCV+CLCuGB	2	5.41E-02	3.36E-01	0.161
32	TYLCV+CLCuGB	3	4.72E-02	2.23E-01	0.212

Annexe 5: Analyse d'extraits purifiés de particules de TYLCV.



Les particules icosaédriques géminées ou simples sont purifiées à partir de *Nicotiana benthamiana* infectés avec du TYLCV-MId ou co-infectés avec du TYLCV-MId et du CLCuGB. Les contenus des 13 fractions des gradients de saccharose et de la resuspension du culot (cu) sont analysés par Southern blot, et pour certains par microscopie électronique (D. Gargani).

La purification des virions est selon (Caciagli et al., 2009) avec les modifications suivantes. La poudre de tissus de plante produite par broyage en N₂ liquide a été homogénéisée pendant 1 min dans le tampon de broyage avec un mixer.

La phase aqueuse a été séparée de la phase chloroforme par centrifugation, filtrée sur 3 épaisseurs de « cheesecloth », et centrifugée à travers un coussin de 10% de saccharose. Le culot mis en suspension est clarifié par une centrifugation à basse vitesse, et chargé sur un gradient de saccharose 10-40% qui est centrifugé pendant 3H45 à 35000 rpm dans un rotor Beckman SW41. Les gradients sont récoltés par fractions de 1mL et analysés par Southern blot après un traitement SDS.

Le contenu de certaines fractions est concentré dans un rotor Beckman Ti70 pendant 2,5 h à 55000 rpm et observée par microscopie.

Les Southern blot révèlent des ADNs viraux dans une large gamme de fractions et avec une grande diversité de taille, et les observations en microscopie électronique sont cohérentes avec une encapsidation du betasatellite CLCuGB dans des particules icosaédrique simples.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIE

- Abhary, M., Patil, B.L., and Fauquet, C.M. (2007). Molecular Biodiversity, Taxonomy, and Nomenclature of Tomato Yellow Leaf Curl-like Viruses. In *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease*, H. Czosnek, ed. (Springer Netherlands), pp. 85–118.
- Abouzid, A.M., Frischmuth, T., and Jeske, H. (1988). A putative replicative form of the abutilon mosaic virus (gemini group) in a chromatin-like structure. *Mol. Gen. Genet. MGG* *212*, 252–258.
- Alberter, B., Ali Rezaian, M., and Jeske, H. (2005). Replicative intermediates of Tomato leaf curl virus and its satellite DNAs. *Virology* *331*, 441–448.
- Alonso-Prados, J.L., Aranda, M.A., Malpica, J.M., García-Arenal, F., and Fraile, A. (1998). Satellite RNA of Cucumber Mosaic Cucumovirus Spreads Epidemically in Natural Populations of Its Helper Virus. *Phytopathology* *88*, 520–524.
- Alvarado, G.R.- (1994). Symptom Modification by Satellite Tobacco Mosaic Virus in Pepper Types and Cultivars Infected with Helper Tobamoviruses. *Phytopathology* *84*, 617.
- Amrao, L., Amin, I., Shahid, M.S., Briddon, R.W., and Mansoor, S. (2010). Cotton leaf curl disease in resistant cotton is associated with a single begomovirus that lacks an intact transcriptional activator protein. *Virus Res.* *152*, 153–163.
- Bach, J., and Jeske, H. (2014). Defective DNAs of beet curly top virus from long-term survivor sugar beet plants. *Virus Res.* *183*, 89–94.
- Belabess, Z., Dallot, S., El-Montaser, S., Granier, M., Majde, M., Tahiri, A., Blenzar, A., Urbino, C., and Peterschmitt, M. (2015). Monitoring the dynamics of emergence of a non-canonical recombinant of Tomato yellow leaf curl virus and displacement of its parental viruses in tomato. *Virology* *486*.
- Bergua, M., Zwart, M.P., El-Mohtar, C., Shilts, T., Elena, S.F., and Folimonova, S.Y. (2014). A Viral Protein Mediates Superinfection Exclusion at the Whole-Organism Level but Is Not Required for Exclusion at the Cellular Level. *J. Virol.* *88*, 11327–11338.
- Bernardi, F., and Timchenko, T. (2008). Réplication des géminivirus: le mécanisme du cercle roulant chez les plantes. *Virologie* *12*, 117–135.
- Briddon, R.W., and Markham, P.G. (2001). Complementation of bipartite begomovirus movement functions by topocuviruses and curtoviruses. *Arch. Virol.* *146*, 1811–1819.
- Briddon, R.W., and Stanley, J. (2006). Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology* *344*, 198–210.
- Briddon, R.W., Mansoor, S., Bedford, I.D., Pinner, M.S., Saunders, K., Stanley, J., Zafar, Y., Malik, K.A., and Markham, P.G. (2001). Identification of DNA Components Required for Induction of Cotton Leaf Curl Disease. *Virology* *285*, 234–243.

- Briddon, R.W., Bull, S.E., Mansoor, S., Amin, I., and Markham, P.G. (2002). Universal primers for the PCR-mediated amplification of DNA β . *Mol. Biotechnol.* *20*, 315–318.
- Briddon, R.W., Bull, S.E., Amin, I., Idris, A.M., Mansoor, S., Bedford, I.D., Dhawan, P., Rishi, N., Siwatch, S.S., Abdel-Salam, A.M., et al. (2003). Diversity of DNA β , a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology* *312*, 106–121.
- Briddon, R.W., Bull, S.E., Amin, I., Mansoor, S., Bedford, I.D., Rishi, N., Siwatch, S.S., Zafar, Y., Abdel-Salam, A.M., and Markham, P.G. (2004). Diversity of DNA 1: a satellite-like molecule associated with monopartite begomovirus-DNA beta complexes. *Virology* *324*, 462–474.
- Briddon, R.W., Brown, J.K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M., Zhou, X., and Fauquet, C.M. (2008). Recommendations for the classification and nomenclature of the DNA-beta satellites of begomoviruses. *Arch. Virol.* *153*, 763–781.
- Briddon, R.W., Ghabrial, S.A., Lin, N.-S., Palukaitis, P., Scholthof, K.-B.G., and Vetter, H.J. (2012). Satellites and Other Virus-dependent Nucleic Acids. In *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, (London ; Waltham, MA: Academic Press), pp. 1211–1219.
- Bringloe, D.H., Gultyaev, A.P., Pospel, M., Pleij, C.W., and Coutts, R.H. (1998). The nucleotide sequence of satellite tobacco necrosis virus strain C and helper-assisted replication of wild-type and mutant clones of the virus. *J. Gen. Virol.* *79*, 1539–1546.
- Brown, J.K., Zerbini, F.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J.C.F., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R.W., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., et al. (2015). Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Arch. Virol.* *160*, 1593–1619.
- Bull, J.C., Godfray, H.C.J., and O'Reilly, D.R. (2001). Persistence of an Occlusion-Negative Recombinant Nucleopolyhedrovirus in *Trichoplusia ni* Indicates High Multiplicity of Cellular Infection. *Appl. Environ. Microbiol.* *67*, 5204–5209.
- Butterbach, P., Verlaan, M.G., Dulleman, A., Lohuis, D., Visser, R.G.F., Bai, Y., and Kormelink, R. (2014). Tomato yellow leaf curl virus resistance by Ty-1 involves increased cytosine methylation of viral genomes and is compromised by cucumber mosaic virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 12942–12947.
- Caciagli, P., Piles, V.M., Marian, D., Vecchiati, M., Masenga, V., Mason, G., Falcioni, T., and Noris, E. (2009). Virion Stability Is Important for the Circulative Transmission of Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus by *Bemisia tabaci*, but Virion Access to Salivary Glands Does Not Guarantee Transmissibility. *J. Virol.* *83*, 5784–5795.
- Celix, A., Rodriguez-Cerezo, E., and Garcia-Arenal, F. (1997). New Satellite RNAs, but No DI RNAs, Are Found in Natural Populations of Tomato Bushy Stunt Tombusvirus. *Virology* *239*, 277–284.

- Célix, A., Burguán, J., and Rodríguez-Cerezo, E. (1999). Interactions between Tombusviruses and Satellite RNAs of Tomato Bushy Stunt Virus: A Defect in sat RNA B1 Replication Maps to ORF1 of a Helper Virus. *Virology* 262, 129–138.
- Chatterji, A., Chatterji, U., Beachy, R.N., and Fauquet, C.M. (2000). Sequence Parameters That Determine Specificity of Binding of the Replication-Associated Protein to Its Cognate Site in Two Strains of Tomato Leaf Curl Virus–New Delhi. *Virology* 273, 341–350.
- Chay, C.A., Guan, X., and Bruening, G. (1997). Formation of Circular Satellite Tobacco Ringspot Virus RNA in Protoplasts Transiently Expressing the Linear RNA. *Virology* 239, 413–425.
- Chen, L.-F., Rojas, M., Kon, T., Gamby, K., XOCONOSTLE-CAZARES, B., and GILBERTSON, R.L. (2009). A severe symptom phenotype in tomato in Mali is caused by a reassortant between a novel recombinant begomovirus (Tomato yellow leaf curl Mali virus) and a betasatellite. *Mol. Plant Pathol.* 10, 415–430.
- Chen, S.-C., Desprez, A., and Olsthoorn, R.C.L. (2010). Structural homology between bamboo mosaic virus and its satellite RNAs in the 5′ untranslated region. *J. Gen. Virol.* 91, 782–787.
- Chernysheva, O.A., and White, K.A. (2005). Modular arrangement of viral cis-acting RNA domains in a tombusvirus satellite RNA. *Virology* 332, 640–649.
- Chin, L.-S., Foster, J.L., and Falk, B.W. (1993). The Beet Western Yellows Virus ST9-Associated RNA Shares Structural and Nucleotide Sequence Homology with Carmo-like Viruses. *Virology* 192, 473–482.
- Choi, S.H., Seo, J.-K., Kwon, S.-J., and Rao, A.L.N. (2012). Helper Virus-Independent Transcription and Multimerization of a Satellite RNA Associated with Cucumber Mosaic Virus. *J. Virol.* 86, 4823–4832.
- Cohen, S., and Antignus, Y. (1994). Tomato Yellow Leaf Curl Virus, a Whitefly-Borne Geminivirus of Tomatoes. In *Advances in Disease Vector Research*, K.F. Harris, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 259–288.
- Collins, R.F., Gellatly, D.L., Sehgal, O.P., and Abouhaidar, M.G. (1998). Self-Cleaving Circular RNA Associated with Rice Yellow Mottle Virus Is the Smallest Viroid-like RNA. *Virology* 241, 269–275.
- Collmer, C.W., and Howell, S.H. (1992). Role of Satellite RNA in the Expression of Symptoms Caused by Plant Viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30, 419–442.
- Cui, X., Tao, X., Xie, Y., Fauquet, C.M., and Zhou, X. (2004). A DNA β associated with Tomato yellow leaf curl China virus is required for symptom induction. *J. Virol.* 78, 13966–13974.
- Cui, X., Li, G., Wang, D., Hu, D., and Zhou, X. (2005a). A Begomovirus DNA β -Encoded Protein Binds DNA, Functions as a Suppressor of RNA Silencing, and Targets the Cell Nucleus. *J. Virol.* 79, 10764–10775.
- Cui, X., Li, Y., Hu, D., and Zhou, X. (2005b). Expression of a begomoviral DNA β gene in transgenic *Nicotiana* plants induced abnormal cell division. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 6B, 83–86.

- Czosnek, H. (2007). *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance* (Springer Science & Business Media).
- Delatte, H., Martin, D.P., Naze, F., Goldbach, R., Reynaud, B., Peterschmitt, M., and Lett, J.-M. (2005). South West Indian Ocean islands tomato begomovirus populations represent a new major monopartite begomovirus group. *J. Gen. Virol.* *86*, 1533–1542.
- Demler, S.A., Rucker, D.G., De Zoeten, G.A., Ziegler, A., Robinson, D.J., and Murant, A.F. (1996). The satellite RNAs associated with the groundnut rosette disease complex and pea enation mosaic virus: sequence similarities and ability of each other's helper virus to support their replication. *J. Gen. Virol.* *77*, 2847–2855.
- Desbiez, C., David, C., Mettouchi, A., Laufs, J., and Gronenborn, B. (1995). Rep protein of tomato yellow leaf curl geminivirus has an ATPase activity required for viral DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 5640–5644.
- Díaz-Pendón, J.A., Cañizares, M.C., Moriones, E., Bejarano, E.R., Czosnek, H., and Navas-Castillo, J. (2010). Tomato yellow leaf curl viruses: ménage à trois between the virus complex, the plant and the whitefly vector. *Mol. Plant Pathol.* *11*, 441–450.
- Dietrich, C. (2003). Fluorescent labelling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected *Nicotiana benthamiana* plants. *J. Gen. Virol.* *84*, 2871–2876.
- Dodds, J.A. (1998). Satellite Tobacco Mosaic Virus. *Annu. Rev. Phytopathol.* *36*, 295–310.
- Dry, I.B., Krake, L.R., Rigden, J.E., and Rezaian, M. a (1997). A novel subviral agent associated with a geminivirus: the first report of a DNA satellite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 7088–7093.
- Escriu, F., Fraile, A., and García-Arenal, F. (2000a). Evolution of Virulence in Natural Populations of the Satellite RNA of Cucumber mosaic virus. *Phytopathology* *90*, 480–485.
- Escriu, F., Perry, K.L., and Garcia-Arenal, F. (2000b). Transmissibility of Cucumber mosaic virus by *Aphis gossypii* correlates with viral accumulation and is affected by the presence of its satellite RNA. *Phytopathology* *90*, 1068–1072.
- Escriu, F., Fraile, A., and García-Arenal, F. (2003). The evolution of virulence in a plant virus. *Evol. Int. J. Org. Evol.* *57*, 755–765.
- Fiallo-Olivé, E., Martínez-Zubiaur, Y., Moriones, E., and Navas-Castillo, J. (2012). A novel class of DNA satellites associated with New World begomoviruses. *Virology* *426*, 1–6.
- Fontes, E.P., Gladfelter, H.J., Schaffer, R.L., Petty, I.T., and Hanley-Bowdoin, L. (1994a). Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell* *6*, 405–416.
- Fontes, E.P., Eagle, P.A., Sipe, P.S., Luckow, V.A., and Hanley-Bowdoin, L. (1994b). Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *J. Biol. Chem.* *269*, 8459–8465.

- Ford, R.J., Barker, A.M., Bakker, S.E., Coutts, R.H., Ranson, N.A., Phillips, S.E.V., Pearson, A.R., and Stockley, P.G. (2013). Sequence-Specific, RNA-Protein Interactions Overcome Electrostatic Barriers Preventing Assembly of Satellite Tobacco Necrosis Virus Coat Protein. *J. Mol. Biol.* *425*, 1050–1064.
- Frischmuth, T., Ringel, M., and Kocher, C. (2001). The size of encapsidated single-stranded DNA determines the multiplicity of African cassava mosaic virus particles. *J. Gen. Virol.* *82*, 673–676.
- Fritsch, C., Mayo, M., and Hemmer, O. (1993). Properties of the satellite RNA of nepoviruses. *Biochimie* *75*, 561–567.
- García-Andrés, S., Monci, F., Navas-Castillo, J., and Moriones, E. (2006). Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology* *350*, 433–442.
- Geetanjali, A.S., Shilpi, S., and Mandal, B. (2013). Natural association of two different betasatellites with Sweet potato leaf curl virus in wild morning glory (*Ipomoea purpurea*) in India. *Virus Genes* *47*, 184–188.
- Ghanim, M., Brumin, M., and Popovski, S. (2009). A simple, rapid and inexpensive method for localization of Tomato yellow leaf curl virus and Potato leafroll virus in plant and insect vectors. *J. Virol. Methods* *159*, 311–314.
- Glick, E., Levy, Y., and Gafni, Y. (2009). The Viral Etiology of Tomato Yellow Leaf Curl Disease – A Review.
- Gonçalves, M.A. (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virol. J.* *2*, 43.
- Gonzalez-Jara, P., Fraile, A., Canto, T., and Garcia-Arenal, F. (2009). The Multiplicity of Infection of a Plant Virus Varies during Colonization of Its Eukaryotic Host. *J. Virol.* *83*, 7487–7494.
- Grieco, F., Lanave, C., and Gallitelli, D. (1997). Evolutionary Dynamics of Cucumber Mosaic Virus Satellite RNA during Natural Epidemics in Italy. *Virology* *229*, 166–174.
- Grigoras, I., Ginzo, A.I. d. C., Martin, D.P., Varsani, A., Romero, J., Mammadov, A.C., Huseynova, I.M., Aliyev, J.A., Kheyr-Pour, A., Huss, H., et al. (2014). Genome diversity and evidence of recombination and reassortment in nanoviruses from Europe. *J. Gen. Virol.* *95*, 1178–1191.
- Guan, H., Carpenter, C.D., and Simon, A.E. (2000). Analysis of cis-Acting Sequences Involved in Plus-Strand Synthesis of a Turnip Crinkle Virus-Associated Satellite RNA Identifies a New Carmovirus Replication Element. *Virology* *268*, 345–354.
- Gutiérrez, S., Yvon, M., Thébaud, G., Monsion, B., Michalakakis, Y., and Blanc, S. (2010). Dynamics of the multiplicity of cellular infection in a plant virus. *PLoS Pathog.* *6*, e1001113.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* *41*, 95–98.

- Heyraud-Nitschke, F., Schumacher, S., Laufs, J., Schaefer, S., Schell, J., and Gronenborn, B. (1995). Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep proteins. *Nucleic Acids Res.* *23*, 910–916.
- Hu, C.-C., Hsu, Y.-H., and Lin, N.-S. (2009). Satellite RNAs and satellite viruses of plants. *Viruses* *1*, 1325–1350.
- Huang, C., Xie, Y., Zhao, L., Ren, H., and Li, Z. (2013). A Naturally Occurring Defective DNA Satellite Associated with a Monopartite Begomovirus: Evidence for Recombination between Alphasatellite and Betasatellite. *Viruses* *5*, 2116–2128.
- Idris, A.M., and Brown, J.K. (2002). Molecular analysis of Cotton leaf curl virus-Sudan reveals an evolutionary history of recombination. *Virus Genes* *24*, 249–256.
- Idris, A.M., Briddon, R.W., Bull, S.E., and Brown, J.K. (2005). Cotton leaf curl Gezira virus-satellite DNAs represent a divergent, geographically isolated Nile Basin lineage: predictive identification of a satDNA REP-binding motif. *Virus Res.* *109*, 19–32.
- Idris, A.M., Shahid, M.S., Briddon, R.W., Khan, A.J., Zhu, J.-K., and Brown, J.K. (2011). An unusual alphasatellite associated with monopartite begomoviruses attenuates symptoms and reduces betasatellite accumulation. *J. Gen. Virol.* *92*, 706–717.
- Ito, T., Kimbara, J., Sharma, P., and Ikegami, M. (2009). Interaction of tomato yellow leaf curl virus with diverse betasatellites enhances symptom severity. *Arch. Virol.* *154*, 1233–1239.
- Jacquemond, M., and Leroux, J.-P. (1982). L'ARN satellite du virus de la mosaïque du concombre II. Etude de la relation virus-ARN satellite chez divers hôtes. *Agronomie* *2*, 55–62.
- Jacquemond, M., Amselem, J., and Tepfer, M. (1988). A gene coding for a monomeric form of cucumber mosaic virus satellite RNA confers tolerance to CMV. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* *1*, 311–316.
- Jeske, H., Lütgemeier, M., and Preiß, W. (2001). DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. *EMBO J.* *20*, 6158–6167.
- Jones, I.M., and Reichmann, M.E. (1973). The proteins synthesized in tobacco leaves infected with tobacco necrosis virus and satellite tobacco necrosis virus. *Virology* *52*, 49–56.
- Jones, A.T., Mayo, M.A., and Duncan, G.H. (1983). Satellite-like properties of small circular RNA molecules in particles of lucerne transient streak virus. *J. Gen. Virol.* *64*, 1167–1173.
- Josefsson, L., King, M.S., Makitalo, B., Brännström, J., Shao, W., Maldarelli, F., Kearney, M.F., Hu, W.-S., Chen, J., Gaines, H., et al. (2011). Majority of CD4+ T cells from peripheral blood of HIV-1-infected individuals contain only one HIV DNA molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 11199–11204.
- Juárez, M., Tovar, R., Fiallo-Olivé, E., Aranda, M.A., Gosálvez, B., Castillo, P., Moriones, E., and Navas-Castillo, J. (2013). First Detection of Tomato leaf curl New Delhi virus Infecting Zucchini in Spain. *Plant Dis.* *98*, 857–857.

- Jung, A., Maier, R., Vartanian, J.-P., Bocharov, G., Jung, V., Fischer, U., Meese, E., Wain-Hobson, S., and Meyerhans, A. (2002). Recombination: Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature* *418*, 144–144.
- Jyothsna, P., Haq, Q.M.I., Singh, P., Sumiya, K.V., Praveen, S., Rawat, R., Briddon, R.W., and Malathi, V.G. (2013). Infection of tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV), a bipartite begomovirus with betasatellites, results in enhanced level of helper virus components and antagonistic interaction between DNA B and betasatellites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *97*, 5457–5471.
- Kaper, J.M., and Tousignant, M.E. (1984). Viral satellites: parasitic nucleic acids capable of modulating disease expression. *Endeavour* *8*, 194–200.
- Kaper, J.M., and Waterworth, H.E. (1977). Cucumber Mosaic Virus Associated RNA 5: Causal Agent for Tomato Necrosis. *Science* *196*, 429–431.
- Kassanis, B. (1962). Properties and behaviour of a virus depending for its multiplication on another. *J. Gen. Microbiol.* *27*, 477–488.
- Kearney, C.M. (1990). A Field Survey for Serogroups and the Satellite RNA of Cucumber Mosaic Virus. *Phytopathology* *80*, 1238.
- Khan, A.J., Idris, A.M., Al-Saady, N.A., Al-Mahruki, M.S., Al-Subhi, A.M., and Brown, J.K. (2008). A divergent isolate of tomato yellow leaf curl virus from Oman with an associated DNA beta satellite: an evolutionary link between Asian and the Middle Eastern virus-satellite complexes. *Virus Genes* *36*, 169–176.
- Kon, T., and Gilbertson, R.L. (2011). Two genetically related begomoviruses causing tomato leaf curl disease in Togo and Nigeria differ in virulence and host range but do not require a betasatellite for induction of disease symptoms. *Arch. Virol.* *157*, 107–120.
- Kon, T., Rojas, M.R., Abdourhamane, I.K., and Gilbertson, R.L. (2009). Roles and interactions of begomoviruses and satellite DNAs associated with okra leaf curl disease in Mali, West Africa. *J. Gen. Virol.* *90*, 1001–1013.
- Kon, T., Rojas, M.R., Abdourhamane, I.K., and Gilbertson, R.L. Complement_kon 2009. *J. Gen. Virol.* *90*, 1001–1013.
- Kouadio, T.K., De Clerck, C., Atcham Agneroh, T., Parisi, O., Lepoivre, P., and Jijakli, H. (2013). Role of satellite RNAs in cucumber mosaic virus-host plant interactions: a review. *Base*.
- Krupovic, M., and Cvirkaite-Krupovic, V. (2011). Virophages or satellite viruses? *Nat. Rev. Microbiol.* *9*, 762–763.
- Kuznetsov, Y.G., Dowell, J.J., Gavira, J.A., Ng, J.D., and McPherson, A. (2010). Biophysical and atomic force microscopy characterization of the RNA from satellite tobacco mosaic virus. *Nucleic Acids Res.* *38*, 8284–8294.
- La Scola, B., Audic, S., Robert, C., Jungang, L., de Lamballerie, X., Drancourt, M., Birtles, R., Claverie, J.-M., and Raoult, D. (2003). A giant virus in amoebae. *Science* *299*, 2033.

La Scola, B., Desnues, C., Pagnier, I., Robert, C., Barrassi, L., Fournous, G., Merchat, M., Suzan-Monti, M., Forterre, P., Koonin, E., et al. (2008). The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature* **455**, 100–104.

Laufs, J., Jupin, I., David, C., Schumacher, S., Heyraud-Nitschke, F., and Gronenborn, B. (1995a). Geminivirus replication: Genetic and biochemical characterization of rep protein function, a review. *Biochimie* **77**, 765–773.

Laufs, J., Traut, W., Heyraud, F., Matzeit, V., Rogers, S.G., Schell, J., and Gronenborn, B. (1995b). In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 3879–3883.

Lefeuvre, P., Martin, D.P., Harkins, G., Lemey, P., Gray, A.J. a, Meredith, S., Lakay, F., Monjane, A., Lett, J.-M., Varsani, A., et al. (2010). The spread of tomato yellow leaf curl virus from the Middle East to the world. *PLoS Pathog.* **6**, e1001164.

Leke, W.N., Kvarnheden, A., Ngane, E.B., Titanji, V.P.K., and Brown, J.K. (2011). Molecular characterization of a new begomovirus and divergent alphasatellite from tomato in Cameroon. *Arch. Virol.* **156**, 925–928.

Leke, W.N., Brown, J.K., Ligthart, M.E., Sattar, N., Njualement, D.K., and Kvarnheden, A. (2012). *Ageratum conyzoides*: A host to a unique begomovirus disease complex in Cameroon. *Virus Res.* **163**, 229–237.

Li, X.H., and Simon, A.E. (1990). Symptom intensification on cruciferous hosts by the virulent satellite RNA of turnip crinkle virus. *Phytopathol. USA*.

Li, D., Behjatnia, S.A.A., Dry, I.B., Randles, J.W., Eini, O., and Rezaian, M.A. (2007). Genomic regions of tomato leaf curl virus DNA satellite required for replication and for satellite-mediated delivery of heterologous DNAs. *J. Gen. Virol.* **88**, 2073–2077.

Lin, M.T. (1977). Partial Purification and Some Properties of Bamboo Mosaic Virus. *Phytopathology* **77**, 1439.

Lin, N.-S. (1992). Genome Properties of Bamboo Mosaic Virus. *Phytopathology* **82**, 731.

Lin, N.-S., and Hsu, Y.-H. (1994). A Satellite RNA Associated with Bamboo Mosaic Potexvirus. *Virology* **202**, 707–714.

Lin, N.-S., Lee, Y.-S., Lin, B.-Y., Lee, C.-W., and Hsu, Y.-H. (1996). The open reading frame of bamboo mosaic potexvirus satellite RNA is not essential for its replication and can be replaced with a bacterial gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 3138–3142.

Liu, Y., Robinson, D.J., and Harrison, B.D. (1998). Defective forms of cotton leaf curl virus DNA-A that have different combinations of sequence deletion, duplication, inversion and rearrangement. *J. Gen. Virol.* **79**, 1501–1508.

Liu, Y.Y., Cooper, J.I., Edwards, M.L., and Hellen, C.U.T. (1991). A satellite RNA of arabis mosaic nepovirus and its pathological impact. *Ann. Appl. Biol.* **118**, 577–587.

- Mansoor, S. (2003). Geminivirus disease complexes: an emerging threat. *Trends Plant Sci.* *8*, 128–134.
- Mansoor, S., Khan, S.H., Bashir, A., Saeed, M., Zafar, Y., Malik, K.A., Briddon, R., Stanley, J., and Markham, P.G. (1999). Identification of a novel circular single-stranded DNA associated with cotton leaf curl disease in Pakistan. *Virology* *259*, 190–199.
- Mansoor, S., Briddon, R.W., Bull, S.E., Bedford, I.D., Bashir, A., Hussain, M., Saeed, M., Zafar, Y., Malik, K.A., Fauquet, C., et al. (2003). Cotton leaf curl disease is associated with multiple monopartite begomoviruses supported by single DNA ? *Arch. Virol.* *148*, 1969–1986.
- Marrou, Duteil, Lot, and Clerjeau (1973). La nécrose de la tomate: une grave virose des tomates en plein champ. *Pepin Hort Maraich* *137*, 37–41.
- Mason, G., Caciagli, P., Accotto, G.P., and Noris, E. (2008). Real-time PCR for the quantitation of Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in tomato plants and in *Bemisia tabaci*. *J. Virol. Methods* *147*, 282–289.
- McGarvey, P.B., Kaper, J.M., Avila-Rincon, M.J., Peña, L., and Diaz-Ruiz, J.R. (1990). Transformed tomato plants express a satellite RNA of cucumber mosaic virus and produce lethal necrosis upon infection with viral RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *170*, 548–555.
- Monsion, B., Duborjal, H., and Blanc, S. (2008). Quantitative Single-letter Sequencing: a method for simultaneously monitoring numerous known allelic variants in single DNA samples. *BMC Genomics* *9*, 85.
- Morilla, G., Krenz, B., Jeske, H., Bejarano, E.R., and Wege, C. (2004). Tete a Tete of Tomato Yellow Leaf Curl Virus and Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus in Single Nuclei. *J. Virol.* *78*, 10715–10723.
- Murant, A.F., and Mayo, M.A. (1982). Satellites of Plant Viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* *20*, 49–68.
- Navas-Castillo, J., Sánchez-Campos, S., Díaz, J.A., Sáez-Alonso, E., and Moriones, E. (1997). First Report of Tomato Yellow Leaf Curl Virus-Is in Spain: Coexistence of Two Different Geminiviruses in the Same Epidemic Outbreak. *Plant Dis.* *81*, 1461–1461.
- Navas-Castillo, J., Sanchez-Campos, S., Noris, E., Louro, D., Accotto, G.P., and Moriones, E. (2000). Natural recombination between Tomato yellow leaf curl virus-Is and Tomato leaf curl virus. *J. Gen. Virol.* *81*, 2797–2801.
- Nawaz-ul-Rehman, M.S., and Fauquet, C.M. (2009). Evolution of geminiviruses and their satellites. *FEBS Lett.* *583*, 1825–1832.
- Nawaz-ul-Rehman, M.S., Mansoor, S., Briddon, R.W., and Fauquet, C.M. (2009). Maintenance of an Old World betasatellite by a New World helper begomovirus and possible rapid adaptation of the betasatellite. *J. Virol.* *83*, 9347–9355.

- Nawaz-ul-Rehman, M.S., Nahid, N., Mansoor, S., Briddon, R.W., and Fauquet, C.M. (2010). Post-transcriptional gene silencing suppressor activity of two non-pathogenic alphasatellites associated with a begomovirus. *Virology* *405*, 300–308.
- Nawaz-ul-Rehman, M.S., Briddon, R.W., and Fauquet, C.M. (2012). A Melting Pot of Old World Begomoviruses and Their Satellites Infecting a Collection of *Gossypium* Species in Pakistan. *PLoS ONE* *7*, e40050.
- Omarov, R.T., Qi, D., and Scholthof, K.-B.G. (2005). The Capsid Protein of Satellite Panicum Mosaic Virus Contributes to Systemic Invasion and Interacts with Its Helper Virus. *J. Virol.* *79*, 9756–9764.
- Palukaitis, P., and García-Arenal, F. (2003). Cucumoviruses. *Adv. Virus Res.* *62*, 241–323.
- Paprotka, T., Metzler, V., and Jeske, H. (2010). The first DNA 1-like alpha satellites in association with New World begomoviruses in natural infections. *Virology* *404*, 148–157.
- Parks, W.P., Casazza, A.M., Alcott, J., and Melnick, J.L. (1968). Adeno-Associated Satellite Virus Interference with the Replication of Its Helper Adenovirus. *J. Exp. Med.* *127*, 91–108.
- Passmore, B.K., Sanger, M., Chin, L.-S., Falk, B.W., and Bruening, G. (1993). Beet western yellows virus-associated RNA: an independently replicating RNA that stimulates virus accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *90*, 10168–10172.
- Patil, B.L., and Dasgupta, I. (2006). Defective Interfering DNAs of Plant Viruses. *Crit. Rev. Plant Sci.* *25*, 47–64.
- Patil, B.L., and Fauquet, C.M. (2010). Differential interaction between cassava mosaic geminiviruses and geminivirus satellites. *J. Gen. Virol.* *91*, 1871–1882.
- Picó, B., Díez, M.J., and Nuez, F. (1996). Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The Tomato yellow leaf curl virus—a review. *Sci. Hortic.* *67*, 151–196.
- Preiss, W., and Jeske, H. (2003). Multitasking in Replication Is Common among Geminiviruses. *J. Virol.* *77*, 2972–2980.
- Qi, D., Omarov, R.T., and Scholthof, K.-B.G. (2008). The complex subcellular distribution of satellite panicum mosaic virus capsid protein reflects its multifunctional role during infection. *Virology* *376*, 154–164.
- Qiu, W., and Scholthof, K.-B.G. (2004). Satellite Panicum Mosaic Virus Capsid Protein Elicits Symptoms on a Nonhost Plant and Interferes with a Suppressor of Virus-Induced Gene Silencing. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *17*, 263–271.
- Rasochova, L., and Miller, W.A. (1996). Satellite RNA of barley yellow dwarf-RPV virus reduces accumulation of RPV helper virus RNA and attenuates RPV symptoms in oats. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI USA*.

- Rasochová, L., Passmore, B.K., Falk, B.W., and Miller, W.A. (1997). The Satellite RNA of Barley Yellow Dwarf Virus-RPV Is Supported by Beet Western Yellows Virus in Dicotyledonous Protoplasts and Plants. *Virology* 231, 182–191.
- Rey, M.E.C., Ndunguru, J., Berrie, L.C., Paximadis, M., Berry, S., Cossa, N., Nuaila, V.N., Mabasa, K.G., Abraham, N., Rybicki, E.P., et al. (2012). Diversity of Dicotyledonous-Infecting Geminiviruses and Their Associated DNA Molecules in Southern Africa, Including the South-West Indian Ocean Islands. *Viruses* 4, 1753–1791.
- Robaglia, C., Bruening, G., Haseloff, J., and Gerlach, W.L. (1993). Evolution and replication of tobacco ringspot virus satellite RNA mutants. *EMBO J.* 12, 2969–2976.
- Robinson, D.J., Ryabov, E.V., Raj, S.K., Roberts, I.M., and Taliansky, M.E. (1999). Satellite RNA is essential for encapsidation of groundnut rosette umbravirus RNA by groundnut rosette assistor luteovirus coat protein. *Virology* 254, 105–114.
- Rojas, M.R., Jiang, H., Salati, R., Xoconostle-Cázares, B., Sudarshana, M.R., Lucas, W.J., and Gilbertson, R.L. (2001). Functional Analysis of Proteins Involved in Movement of the Monopartite Begomovirus, Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *Virology* 291, 110–125.
- Romay, G., Chirinos, D., Geraud-Pouey, F., and Desbiez, C. (2010). Association of an atypical alphasatellite with a bipartite New World begomovirus. *Arch. Virol.* 155, 1843–1847.
- Rubino, L. (2004). Expression of tombusvirus open reading frames 1 and 2 is sufficient for the replication of defective interfering, but not satellite, RNA. *J. Gen. Virol.* 85, 3115–3122.
- Russo, M., Burgyan, J., and Martelli, G.P. (1994). Molecular biology of tombusviridae. *Adv. Virus Res.* 44, 381–428.
- Saeed, M., Zafar, Y., Randles, J.W., and Rezaian, M.A. (2007). A monopartite begomovirus-associated DNA beta satellite substitutes for the DNA B of a bipartite begomovirus to permit systemic infection. *J. Gen. Virol.* 88, 2881–2889.
- Sanger, M., Passmore, B., Falk, B.W., Bruening, G., Ding, B., and Lucas, W.J. (1994). Symptom Severity of Beet Western Yellows Virus Strain ST9 Is Conferred by the ST9-Associated RNA and Is Not Associated with Virus Release from the Phloem. *Virology* 200, 48–55.
- Saunders, K., and Stanley, J. (1999). A Nanovirus-like DNA Component Associated with Yellow Vein Disease of *Ageratum conyzoides*: Evidence for Interfamilial Recombination between Plant DNA Viruses. *Virology* 264, 142–152.
- Saunders, K., Lucy, A., and Stanley, J. (1992). RNA-primed complementary-sense DNA synthesis of the geminivirus African cassava mosaic virus. *Nucleic Acids Res.* 20, 6311–6315.
- Saunders, K., Bedford, I.D., Briddon, R.W., Markham, P.G., Wong, S.M., and Stanley, J. (2000). A unique virus complex causes *Ageratum* yellow vein disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6890–6895.

- Saunders, K., Bedford, I.D., and Stanley, J. (2001). Pathogenicity of a Natural Recombinant Associated with Ageratum Yellow Vein Disease: Implications for Geminivirus Evolution and Disease Aetiology. *Virology* 282, 38–47.
- Saunders, K., Salim, N., Mali, V.R., Malathi, V.G., Briddon, R., Markham, P.G., and Stanley, J. (2002a). Characterisation of Sri Lankan Cassava Mosaic Virus and Indian Cassava Mosaic Virus: Evidence for Acquisition of a DNA B Component by a Monopartite Begomovirus. *Virology* 293, 63–74.
- Saunders, K., Bedford, I.D., and Stanley, J. (2002b). Adaptation from whitefly to leafhopper transmission of an autonomously replicating nanovirus-like DNA component associated with ageratum yellow vein disease. *J. Gen. Virol.* 83, 907–913.
- Saunders, K., Norman, A., Gucciardo, S., and Stanley, J. (2004). The DNA β satellite component associated with ageratum yellow vein disease encodes an essential pathogenicity protein (β C1). *Virology* 324, 37–47.
- Saunders, K., Briddon, R.W., and Stanley, J. (2008). Replication promiscuity of DNA- satellites associated with monopartite begomoviruses; deletion mutagenesis of the Ageratum yellow vein virus DNA- satellite localizes sequences involved in replication. *J. Gen. Virol.* 89, 3165–3172.
- Scholthof, K.-B.G. (1999). A synergism induced by satellite panicum mosaic virus. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 12, 163–166.
- Sehgal, O.P., Sinha, R.C., Gellatly, D.L., Ivanov, I., and AbouHaidar, M.G. (1993). Replication and encapsidation of the viroid-like satellite RNA of lucerne transient streak virus are supported in divergent hosts by cocksfoot mottle virus and turnip rosette virus. *J. Gen. Virol.* 74, 785–785.
- Shahid, M.S., Ikegami, M., Waheed, A., Briddon, R.W., and Natsuaki, K.T. (2014). Association of an Alphasatellite with Tomato Yellow Leaf Curl Virus and Ageratum Yellow Vein Virus in Japan is Suggestive of a Recent Introduction. *Viruses* 6, 189–200.
- Sicard, A. (2014). These_AnneSicard.pdf.
- Simon, A.E., Roossinck, M.J., and Havelda, Z. (2004). PLANT VIRUS SAT_{EL}LITE AND DEFECTIVE INTERFERING RNAs: New Paradigms for a New Century. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 415–437.
- Sivalingam, P.N., and Varma, A. (2012). Role of betasatellite in the pathogenesis of a bipartite begomovirus affecting tomato in India. *Arch. Virol.* 157, 1081–1092.
- Sivalingam, P.N., Malathi, V.G., and Varma, A. (2010). Molecular diversity of the DNA- β satellites associated with tomato leaf curl disease in India. *Arch. Virol.* 155, 757–764.
- Stanley, J. (1995). Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology* 206, 707–712.

- Stanley, J., Saunders, K., Pinner, M.S., and Wong, S.M. (1997). Novel Defective Interfering DNAs Associated with Ageratum Yellow Vein Geminivirus Infection of *Ageratum conyzoides*. *Virology* 239, 87–96.
- Taliansky, M.E., Ryabov, E.V., Robinson, D.J., and Palukaitis, P. (1998). Tomato Cell Death Mediated By Complementary Plant Viral Satellite RNA Sequences. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 11, 1214–1222.
- Tan, P.H., Wong, S.M., Wu, M., Bedford, I.D., Saunders, K., and Stanley, J. (1995). Genome organization of ageratum yellow vein virus, a monopartite whitefly-transmitted geminivirus isolated from a common weed. *J. Gen. Virol.* 76, 2915–2922.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- Tiendrébéogo, F., Lefeuvre, P., Hoareau, M., Villemot, J., Konaté, G., Traoré, A.S., Barro, N., Traoré, V.S., Reynaud, B., and Traoré, O. (2010). Molecular diversity of Cotton leaf curl Gezira virus isolates and their satellite DNAs associated with okra leaf curl disease in Burkina Faso. *Virol J* 7, 48.
- Timchenko, T. (2006). Infectivity of nanovirus DNAs: induction of disease by cloned genome components of Faba bean necrotic yellows virus. *J. Gen. Virol.* 87, 1735–1743.
- Timchenko, T., and Bernardi, F. (2007). Les nanovirus, petits virus de plantes: similitudes et différences avec les géminivirus. *Virologie* 11, 27–42.
- Tsai, M.-S., Hsu, Y.-H., and Lin, N.-S. (1999). Bamboo Mosaic Potexvirus Satellite RNA (satBaMV RNA)-Encoded P20 Protein Preferentially Binds to satBaMV RNA. *J. Virol.* 73, 3032–3039.
- Turner, P.E., Burch, C.L., Hanley, K.A., and Chao, L. (1999). Hybrid Frequencies Confirm Limit to Coinfection in the RNA Bacteriophage $\phi 6$. *J. Virol.* 73, 2420–2424.
- Ueda, S., Kimura, T., Onuki, M., Hanada, K., and Iwanami, T. (2004). Three distinct groups of isolates of Tomato yellow leaf curl virus in Japan and construction of an infectious clone. *J. Gen. Plant Pathol.* 70, 232–238.
- Ueda, S., Takeuchi, S., Okabayashi, M., Hanada, K., Tomimura, K., and Iwanami, T. (2005). Evidence of a new Tomato yellow leaf curl virus in Japan and its detection using PCR. *J. Gen. Plant Pathol.* 71, 319–325.
- Ueda, S., Onuki, M., Hanada, K., and Takanami, Y. (2008). Unique grouping of the Far East Asian begomovirus complex based on sequence analyses of the DNA-A genome and associated DNA β satellite molecules isolated from tomato, honeysuckle and Eupatorium plants in Japan. *Arch. Virol.* 153, 417–426.
- Ueda, S., Onuki, M., Yamashita, M., and Yamato, Y. (2012). Pathogenicity and insect transmission of a begomovirus complex between tomato yellow leaf curl virus and Ageratum yellow vein betasatellite. *Virus Genes* 44, 338–344.

- Urbino, C., Thebaud, G., Granier, M., Blanc, S., and Peterschmitt, M. (2008). A novel cloning strategy for isolating, genotyping and phenotyping genetic variants of geminiviruses. *Viol. J.* **5**, 135.
- Vijayapalani, P., Chen, J.C.-F., Liou, M.-R., Chen, H.-C., Hsu, Y.-H., and Lin, N.-S. (2012). Phosphorylation of bamboo mosaic virus satellite RNA (satBaMV)-encoded protein P20 downregulates the formation of satBaMV-P20 ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acids Res.* **40**, 638–649.
- Vijayapalani, palani, Kasiviswanathan, V., Chen, J.C.-F., Chen, W., Hsu, Y.-H., and Lin, N.-S. (2006). The Arginine-Rich Motif of Bamboo mosaic virus Satellite RNA-Encoded P20 Mediates Self-Interaction, Intracellular Targeting, and Cell-to-Cell Movement. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **19**, 758–767.
- Vuillaume, F., Thébaud, G., Urbino, C., Forfert, N., Granier, M., Froissart, R., Blanc, S., and Peterschmitt, M. (2011). Distribution of the Phenotypic Effects of Random Homologous Recombination between Two Virus Species. *PLoS Pathog.* **7**, e1002028.
- Wartig, L., Kheyr-Pour, A., Noris, E., De Kouchkovsky, F., Jouanneau, F., Gronenborn, B., and Jupin, I. (1997). Genetic Analysis of the Monopartite Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus: Roles of V1, V2, and C2 ORFs in Viral Pathogenesis. *Virology* **228**, 132–140.
- Wu, G., and Kaper, J.M. (1995). Competition of viral and satellite RNAs of cucumber mosaic virus for replication in vitro by viral RNA-dependent RNA polymerase. *Res. Virol.* **146**, 61–67.
- Wu, P.-J., and Zhou, X.-P. (2005). Interaction between a Nanovirus-like Component and the Tobacco Curly Shoot Virus/Satellite Complex. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **37**, 25–31.
- Wu, J.B., Cai, J.H., and Zhou, X.P. (2007). A new begomovirus associated with yellow vein disease of *Siegesbeckia glabrescens*. *Plant Pathol.* **56**, 343–343.
- Xie, Q., Bu, W., Bhatia, S., Hare, J., Somasundaram, T., Azzi, A., and Chapman, M.S. (2002). The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 10405–10410.
- Xiong, Q., Fan, S., Wu, J., and Zhou, X. (2007). Ageratum yellow vein China virus is a distinct begomovirus species associated with a DNA β molecule. *Phytopathology* **97**, 405–411.
- Yang, X., Guo, W., Ma, X., An, Q., and Zhou, X. (2011). Molecular characterization of tomato leaf curl China virus, infecting tomato plants in China, and functional analyses of its associated betasatellite. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 3092–3101.
- Zhang, H., Gong, H., and Zhou, X. (2009). Molecular characterization and pathogenicity of tomato yellow leaf curl virus in China. *Virus Genes* **39**, 249–255.
- Zhang, L., Zitter, T.A., and Palukaitis, P. (1991). Helper virus-dependent replication, nucleotide sequence and genome organization of the satellite virus of maize white line mosaic virus. *Virology* **180**, 467–473.

Zhang, T., Luan, J.-B., Qi, J.-F., Huang, C.-J., Li, M., Zhou, X.-P., and Liu, S.-S. (2012). Begomovirus-whitefly mutualism is achieved through repression of plant defences by a virus pathogenicity factor. *Mol. Ecol.* *21*, 1294–1304.

Zhou, X. (2013). Advances in Understanding Begomovirus Satellites. *Annu. Rev. Phytopathol.* *51*, 357–381.